

”FENOTIPO CELULAR DE LAS NEURONAS SENSITIVAS AFECTADAS EN LA ATAXIA DE FRIEDREICH”

Memoria presentada por

Belén Mollá Moliner

bajo la dirección de Francesc Palau Martínez y Pilar González Cabo

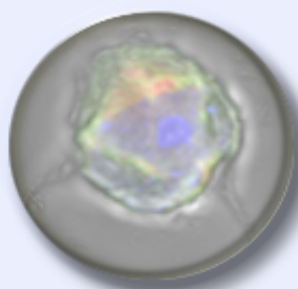
para optar al grado de Doctora por la Universitat de València

Facultat de Ciències Biològiques

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Valencia, Septiembre 2015





D. Francesc Palau Martínez, Doctor en Medicina, Profesor de Investigación del CSIC y Profesor Visitante de Pediatría, Universitat de Barcelona, Director del Instituto Pediátrico de Enfermedades Raras (IPER) del Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona, y Director Científico del Centro de Investigaciones Biomédicas En Red de Enfermedades Raras (CIBERER) del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) y
Dña. Pilar González Cabo, Doctora en Ciencias Biológicas e Investigadora Acreditada del Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER) en el Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF) de Valencia,

CERTIFICAN:

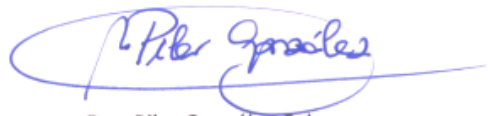
Que Dña. Belén Mollá Moliner, licenciada en Farmacia por la Universitat de València, ha realizado bajo su codirección el trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título **“Fenotipo celular de las neuronas sensitivas afectadas en la ataxia de Friedreich”**.

Revisado el presente trabajo, expresan su conformidad para la presentación del mismo por considerar que reúne los requisitos necesarios para ser sometido a su defensa ante el Tribunal correspondiente, para la obtención del grado de Doctora.

En Valencia, Septiembre 2015



Prof. Dr. Francesc Palau Martínez



Dra. Pilar González Cabo

D. José-Enrique O'Connor Blasco, Doctor en Farmacia y Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Universitat de València,

CERTIFICA:

Que Dña. Belén Mollá Moliner, licenciada en Farmacia por la Universitat de València, ha realizado bajo su tutela académica el trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título **"Fenotipo celular de las neuronas sensitivas afectadas en la ataxia de Friedreich"**.

Revisado el presente trabajo, expresa su conformidad para la presentación del mismo por considerar que reúne los requisitos necesarios para ser sometido a su defensa ante el Tribunal correspondiente, para la obtención del grado de Doctora.

En Valencia, Septiembre 2015

A handwritten signature in blue ink, consisting of a stylized 'e' followed by 'f' and a large 'R'.

Dr. José-Enrique O'Connor Blasco

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero mostrar mi mayor agradecimiento al Dr. Francesc Palau Martínez y a la Dra. Pilar González Cabo, directores de esta tesis doctoral, ya que sin su orientación y apoyo esta tesis no hubiera sido posible.

Durante mis estudios en farmacia descubrí la complejidad de la fisiología del cuerpo humano, de las diferentes patologías que lo deterioran y lo sorprendente de poder actuar farmacológicamente sobre los procesos patológicos y modificarlos. Unos años después, y gracias al empeño de mi amiga Pili, llegué a la investigación biomédica y me dio la oportunidad de conocer y compartir con ella esta preciosa profesión.

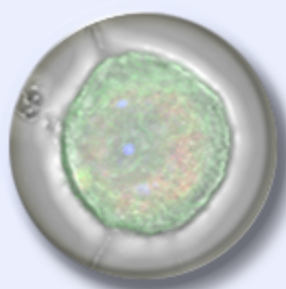
A lo largo de mis años de ayudante de investigación muchas son las personas que me han enseñado y han dado forma a todo lo que ahora se en el campo de la biomedicina. Quiero mostrar un agradecimiento muy especial a la Dra. Marta Casado, al Dr. Santiago Vernia y a la Dra. Carme Cucarella, que vivieron mis inicios en el laboratorio, y que compartieron conmigo todos sus conocimientos y me prestaron toda su ayuda con gran generosidad. Me enseñaron mucho sobre la exigencia del trabajo bien hecho y compartimos estupendos años de investigación, a lo largo de los cuales realicé mis cursos de doctorado y defendí mi trabajo científico con la obtención del Diploma de Estudios Avanzados.

Mi traslado al laboratorio del Dr. Francesc Palau me aportó multitud de nuevos compañeros, desde estudiantes a investigadores postdoctorales, que han enriquecido enormemente mi trabajo científico. Mi gratitud es para todos ellos, pero en especial para el "frataxin team" compuesto por las maravillosas chicas frataxina Fátima, Arantxa, Diana y la jefa Pili, sin vuestro excelente trabajo esta tesis no existiría, muchas gracias por hacerla posible. Sin poder olvidar al "GDAP1 team" con Maribel, David, Anna, Lola, Manoli, Paula, Azahara, Sara e Isabel, al equipo de la Dra. Carmen Espinós con Edu y Vini, al equipo del Dr. Ibo Galindo con Amalia, María y Víctor al equipo de la Dra. Janet Joenicka con Estela y Estrella. Y por supuesto al gran jefe Paco por su exigencia incansable que nos hace avanzar siempre hacia adelante.

Gracias a todos los integrantes del Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV) y del Centro de Investigación Príncipe Felipe de Valencia (CIPF) que hacen posible que estos centros de investigación tengan un "color" especial y que trabajemos tan "a gusto".

Mi agradecimiento más profundo es para mis padres que gracias a su trabajo incansable me han dado la oportunidad de disfrutar de mi profesión y de la realización de esta tesis doctoral. A Ximo por su amor y apoyo incansables que me han permitido concluir este proyecto. Y a mi hermana y familia por su amor incansable.

En gran parte somos lo que nuestra familia, amigos y compañeros nos enseñan. Yo he tenido la suerte de compartir con todos vosotros algunos años o toda una vida, por ello muchas gracias a todos por vuestras enseñanzas.



ÍNDICE

Índice de abreviaturas	I
Índice de figuras.....	V
Índice de tablas	IX
INTRODUCCIÓN.....	1
1. La ataxia de Friedreich (FRDA)	3
1.1. Modelos animales de FRDA.	6
1.2. Terapias actuales en la FRDA	7
1.2.1. Antioxidantes.....	8
1.2.2. Quelantes del hierro	9
1.2.3. Modificadores de los niveles de frataxina	9
1.2.4. Nuevas estrategias terapéuticas	10
2. Neuronas sensitivas periféricas y ganglio de la raíz dorsal.....	13
3. Neuropatías periféricas hereditarias.....	18
4. Programas intrínsecos celulares de eliminación axonal y su implicación en la neurodegeneración	20
4.1. La eliminación axonal durante el desarrollo	20
4.1.1. Degeneración axonal	20
4.1.2. Retracción axonal	21
4.1.3. Efusión de axosomas.....	22
4.2. La eliminación axonal patológica	23
4.2.1. Degeneración axonal aguda	23
4.2.2. Degeneración Walleriana	24
4.2.3. Degeneración <i>dying-back</i>	25
4.2.4. Degeneración <i>Wallerian-like</i>	27
4.2.5. Modelo de lesión focal.....	27

5. La mitocondria y su implicación en patología	28
5.1. Bioenergética mitocondrial y regulación del estado REDOX de la célula	29
5.2. Regulación de OXPHOS y producción de ATP	33
5.3. Apoptosis	34
5.4. Autofagia	34
5.5. Homeostasis del calcio	36
6. Receptores acoplados a proteína G (GPCR) y proteínas G.....	40
6.1. Familia B o de clase II de GPCR	42
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	45
1. Hipótesis	47
2. Objetivos	47
MATERIALES Y MÉTODOS	49
1. Material biológico	51
1.1. Animales de experimentación	51
1.2. Obtención de las muestras de tejidos de ratón	51
1.3. Cultivos primarios de ganglio dorsal	51
2. Anticuerpos y tinciones	52
3. Amplificación y genotipado del modelo murino FRDA.....	54
3.1. Sistema de cruces de la colonia	54
3.2. Sistema de genotipado	55
4. Experimentos in vivo.....	58
4.1. Evaluación del peso corporal	58
4.2. Análisis de supervivencia	58
4.2.1. Curvas de supervivencia.....	59
4.2.2. Regresión de Cox	59

4.3. Evaluación de la función locomotora	60
4.3.1. Prueba del rotarod	60
4.3.2. Prueba de la barra de equilibrio	60
4.3.3. Prueba del palo	61
5. Análisis de proteínas	62
5.1. Inmunodetección de la expresión de proteínas por western blot	62
5.2. Inmunocitoquímica de la expresión de proteínas por inmunofluorescencia indirecta.....	63
6. Estudio del perfil proteómico por 2D-DIGE	63
7. Análisis de la expresión génica en neuronas sensitivas.....	64
7.1. Aislamiento de las neuronas propioceptivas del ganglio dorsal.....	64
7.2. Aislamiento de RNA, RT-PCR y PCR Array.....	65
8. Experimentos <i>in vitro</i>: ensayos celulares	66
8.1. Determinación de la función mitocondrial: potencial de membrana mitocondrial.....	66
8.2. Determinación de los niveles de estrés oxidativo: producción de anión superóxido intracelular	67
8.3. Estudio de la homeostasis del calcio <i>in vivo</i> : niveles de calcio citosólicos.....	67
8.4. Determinación de la actividad calpaína <i>in vivo</i>	68
8.5. Determinación de la actividad de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) <i>in vivo</i>	69
9. Análisis morfométrico	69
9.1. Determinación de parámetros morfológicos neuronales y distribución neuronal	69
9.2. Determinación de parámetros morfológicos mitocondriales y distribución mitocondrial.....	70

10. Microscopía.....	72
10.1. Microscopía electrónica.....	72
10.2. Análisis por microscopía óptica de transmisión vertical	73
10.3. Análisis por microscopía confocal	73
11. Análisis estadístico	73
RESULTADOS.....	75
1. Identificación de nuevos marcadores específicos de neuronas propioceptivas del ganglio dorsal de ratón.....	77
2. Estudio fisiopatológico del déficit de frataxina en el modelo murino FRDA	82
2.1. La expresión de frataxina correlaciona con el número de copias del transgén YG8	82
2.2. Caracterización fenotípica del modelo murino FRDA	84
2.2.1. El déficit de frataxina provoca el aumento del peso corporal del modelo murino FRDA.....	84
2.2.2. El déficit de frataxina no influye en la supervivencia del modelo murino FRDA.....	85
2.2.3. Los ratones deficientes en frataxina presentan defectos en la coordinación motora, el equilibrio y la propiocepción.....	87
2.3. Estudio de la fisiopatología tisular del déficit de frataxina	92
2.3.1. La frataxina presenta una expresión diferencial entre los tejidos neuronales.....	92
2.3.2. Los tejidos neuronales deficientes en frataxina muestran afectación mitocondrial y estrés oxidativo	94
2.4. Fenotipado celular de las neuronas sensitivas del ganglio dorsal en cultivo primario	97
2.4.1. La frataxina muestra una expresión mitocondrial correcta en la neurona sensitiva.....	97

2.4.2. El déficit de frataxina provoca cambios morfológicos en los somas neuronales <i>in vivo</i>	99
2.4.3. El déficit de frataxina provoca distrofia axonal en las neuronas sensitivas	102
2.4.4. El déficit de frataxina provoca una disfunción mitocondrial	118
2.4.5. El déficit de frataxina provoca defectos en la morfología mitocondrial	127
3. Los ratones deficientes en frataxina presentan un defecto en la expresión diferencial de proteínas del ganglio dorsal.....	135
3.1. La falta de frataxina causa el déficit de subunidades proteicas de los complejos de la OXPHOS y de enzimas antioxidantes.....	137
3.2. La falta de frataxina causa el déficit de las vías de señalización por calcio a través de receptores acoplados a proteínas G (GPCR).....	141
3.3. La falta de frataxina causa el déficit de proteínas con actividad dependiente del calcio.....	145
4. Nuevas aproximaciones terapéuticas para el rescate axonal en el déficit de frataxina	147
4.1. Modulación del Ca^{2+} citosólico y de la actividad calpaína y su implicación en el proceso de neurodegeneración.....	147
4.1.1. El déficit de frataxina presenta una disminución de la actividad calpaína.....	148
4.1.2. La quelación del calcio y la inhibición enzimática de la calpaína regulan su actividad proteolítica	150
4.1.3. La quelación del calcio y la inhibición enzimática de la calpaína revierten la distrofia axonal en el déficit de frataxina	154
4.2. Modulación del cAMP, cGMP y los niveles de calcio citosólicos y su implicación en el proceso de neurodegeneración	158
4.2.1. El déficit de frataxina presenta un aumento de los niveles de Ca^{2+} citosólicos en los focos donde se forman los esferoides axonales	160
4.2.2. Los inhibidores selectivos de PDE restauran los niveles de calcio citosólico en el déficit de frataxina	162

4.2.3. Los inhibidores selectivos de PDE revierten la distrofia axonal en el déficit de frataxina	164
DISCUSIÓN	169
1. El YG8R como modelo murino de degeneración <i>dying-back in vivo</i> e <i>in vitro</i> en la FRDA	171
2. La disfunción mitocondrial es el sitio de daño inicial que origina el mecanismo de neurodegeneración <i>dying-back</i>	175
3. Defectos en la señalización por calcio en la neurodegeneración <i>dying-back</i> en la FRDA	182
4. Defectos en la señalización por GPCR, PACAP/PAC1R, en la neurodegeneración <i>dying-back</i> en la FRDA.....	184
5. Nuevas aproximaciones terapéuticas en la FRDA	185
CONCLUSIONES	186
Anexos	186
BIBLIOGRAFÍA	186

Índice de abreviaturas

Δp ,	fuerza protonmotriz o potencial quimiosmótico
ΔpH ,	potencial químico o gradiente de protones a través de la MMI
$\Delta\psi_m$,	potencial eléctrico o gradiente de electrones a través de la MMI
$[Ca^{2+}]_c$,	concentración de Ca^{2+} citosólica
$[Ca^{2+}]_i$,	concentración de Ca^{2+} intracelular
aa,	aminoácido
AC,	adenilato ciclasa
acetil-CoA,	acetil coenzima A
ADP,	adenosín difosfato
AraC,	1- β -D-arabinofuranosilcitosina
ATP,	adenosín trifosfato o adenosina-5'-trifosfato
AUC,	área bajo la curva (<i>area under curve</i>)
BAPTA,	1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid
BDNF,	factor neurotrófico derivado del cerebro (<i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>)
Ca^{2+} ,	ión calcio
cAMP,	adenosina-5'-monofosfato cíclico (<i>Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate</i>)
CCCP,	Carbonil cianuro m-clorofenilhidrazona
cDNA,	ácido desoxirribonucleico complementario (<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>)
cGMP,	guanosina-5'-monofosfato cíclico (<i>cyclic guanosine monophosphate</i>)
C_i , C_{ii} , C_{iii} , C_{iv} ,	complejo I, complejo II, complejo III, complejo IV de la CTE
Cit c,	citocromo c
CO_2 ,	dióxido de carbono
CoQ,	coenzima Q o ubiquinona
CRAC,	canal de Ca^{2+} activado por liberación de Ca^{2+} (<i>Ca²⁺-release activated Ca²⁺</i>)
CRE,	elemento de respuesta al cAMP (<i>cAMP response element</i>)
CREB,	proteína de unión al elemento de respuesta al cAMP (<i>cAMP response element-binding</i>)
CTE,	Cadena de Transporte de Electrones
Cu^+ ,	ión cobre
DAG,	diacilglicerol
<i>div</i> ,	días <i>in vitro</i>
DMSO,	dimetilsulfóxido
DNA,	ácido desoxirribonucleico (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTPs,	deoxynucleotido trifosfatos
DTT,	ditiotreititol

EDTA,	ácido etilendiaminotetracético (<i>ethylenediamine tetraacetic</i>)
EGTA,	ácido etilenglicol-bis-(β-aminetiléter)-N,N,N',N'-tetracético
ELA,	esclerosis lateral amiotrófica
ETF,	flavoproteína transferidora de electrones (<i>electron transfer flavoprotein</i>)
FAD ⁺ ,	flavina adenina dinucleótido oxidado
FADH ₂ ,	flavina adenina dinucleótido reducido
Fe ²⁺ ,	ión hierro
Fe-S	centro hierro-azufre
FMN,	flavina mononucleotido
FRDA	ataxia de Friedreich (<i>Friedreich's Ataxia</i>)
GAA,	Guanina-Adenina-Adenina, trinucleótido de bases nitrogenadas
GC,	guanilato ciclasa
GDNF,	factor neurotrófico derivado de célula glial (<i>Glial cell-Derived Neurotrophic Factor</i>)
GPCR,	receptor acoplado a proteína G (<i>G protein coupled receptor</i>)
H ⁺ ,	protones
H ₂ O ₂ ,	peróxido de hidrógeno
HEPES,	2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid
HDAC,	deacetilasas de histonas (<i>Histone deacetylases</i>)
IFI,	inmunofluorescencia indirecta
IP ₃ ,	Inositol trifosfato (<i>Inositol triphosphate</i>)
ISC,	centros Fe-S (<i>Iron-Sulfur Cluster</i>)
ITI,	intervalo de tiempo interexperimental
kDa,	KiloDalton
MgCl ₂ ,	cloruro de magnesio
mm,	milímetros
MME,	Membrana Mitocondrial Externa
MMI,	Membrana Mitocondrial Interna
MP,	Membrana Plasmática
mRNA,	ácido ribonucleico mensajero
mtDNA,	ácido desoxirribonucleico mitocondrial (<i>mitochondrial DNA</i>)
Na ⁺ ,	ión sodio
Na ₃ VO ₄ ,	ortovanadato de sodio
NAD ⁺ ,	nicotinamida adenina dinucleótido oxidado
NADH,	nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NaF,	fluoruro de sodio
NGF,	factor de crecimiento nervioso (<i>Nerve Growth Factor</i>)
NO,	óxido nítrico
NT-3,	neurotrofina-3 (<i>neurotrophin-3</i>)
NT-4,	neurotrofina-4 (<i>neurotrophin-4</i>)
O ₂ ,	oxígeno molecular
O ₂ ^{-•} ,	anión superóxido

O ₂ ²⁻ ,	anión peróxido
OH·,	radical hidroxilo
ONOO ⁻ ,	peroxinitrito
OXPPOS,	fosforilación oxidativa (<i>oxidative phosphorylation</i>)
pb,	pares de bases
PB,	tampón fosfato (<i>phosphate buffer</i>)
PCR,	reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
P _i ,	fosfato inorgánico
PIP ₂ ,	fosfatidil inositol 4,5-bifosfato
PK,	proteína quinasa
PKA,	proteína quinasa A
PKC,	proteína quinasa C
PL,	fosfolipasa (<i>Phospholipase</i>)
PLCβ,	fosfolipasa Cβ (<i>phospholipase Cβ</i>)
PMSF,	fluoruro de fenilmetilsulfonilo (<i>phenylmethanesulfonylfluoride</i>)
PPTM,	poro de permeabilidad transitoria mitocondrial
PVDF,	fluoruro de polivinilideno
RE,	Retículo Endoplásmico
RNA,	ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i>)
RNS,	especies reactivas del nitrógeno (<i>Reactive Nitrogen Species</i>)
ROC,	canal de calcio operado por receptor (<i>Receptor-operated Ca²⁺ channel</i>)
ROS,	especies reactivas del oxígeno (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
RT-PCR,	PCR transcriptasa reversa (<i>reverse transcriptase PCR</i>)
RT-qPCR,	PCR cuantitativa a tiempo real (<i>Real time quantitative PCR</i>)
S.E.M,	error estándar de la media (<i>Standard Error Media</i>)
SDS,	dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE,	electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SERCA,	ATPasa de Ca ²⁺ específica de retículo sarco(endo)plásmico (<i>Sarco(Endo)plasmic Reticulum Calcium ATPase</i>)
SNC,	sistema nervioso central
SNP,	sistema nervioso periférico
SOC,	canal de calcio operado por almacenes (<i>Store-operated Ca²⁺ channel</i>)
SOCE,	entrada de Ca ²⁺ operada por los almacenes (<i>Store-operated calcium entry</i>)
tBuBHQ,	2,5-di-(ter-butil)-1,4-benzohidroquinona
TK,	tirosin quinasa (tyrosine kinases)
TrisHCl,	tris(hidroximetil)aminometano clorhidrato
TrK,	receptor quinasa relacionado con tropomiosina (<i>tropomyosin-related kinase</i>)
TRPC,	receptor de potencial transitorio (<i>Transient receptor potential cation channels</i>)

VDAC,	canales aniónico voltaje dependiente (<i>voltage-dependent anion channels</i>)
VOC,	canal de calcio dependiente de Voltaje (<i>Voltage-gated Ca²⁺ channel</i>)
WB,	<i>Western blot</i>
YAC,	cromosoma artificial de levadura (<i>Yeast Artificial Chromosome</i>)

Índice de figuras

Figura 1. Dibujo esquemático de la patología axonal en el SNP y SNC	4
Figura 2. Progreso de la investigación y el desarrollo de nuevos compuestos terapéuticos.....	12
Figura 3. Nervio periférico y neuronas sensitivas del ganglio dorsal.....	14
Figura 4. Esquema de la diversa población neuronal del ganglio dorsal y los parámetros para su clasificación.....	15
Figura 5. Interacciones entre las neurotrofinas y sus receptores.....	16
Figura 6. Interacción de neurotrofina con los receptores Trk y p75NTR y las vías de señalización activadas a través de cada uno de los receptores.....	17
Figura 7. Transactivación de receptores tirosin quinasa Trk por receptores GPCR.....	18
Figura 8. Mecanismos de eliminación axonal.....	22
Figura 9. Representación del sistema global OXPPOS y otras flavoproteínas transferidoras de electrones.....	32
Figura 10. Renovación de la mitocondria vía adaptadores de la autofagia.....	35
Figura 11. Biogénesis, maduración y dinámica del transporte autofagosomas y autolisosomas en axones sanos y degenerados.....	36
Figura 12. Entrada de Ca^{2+} operada por receptores (ROC) y operada por almacenes (SOCE) y su implicación en las funciones neuronales.....	38
Figura 13. Implicación de la mitocondria en la señalización por Ca^{2+} transorgánulos después de la liberación intracelular del Ca^{2+} por IP3 y del SOCE.....	39
Figura 14. Mecanismos canónicos de la señalización GPCR.....	42
Figura 15. Esquema de las cascadas de señalización mediadas por el receptor PAC1R que concluyen en una gran variedad de funciones neuronales.....	44
Figura 16. Esquema de la estrategia genética para deleccionar el exón 4 del gen de la frataxina murina.....	55
Figura 17. Esquema de la estrategia genética para aumentar las repeticiones GAA en el intrón 1 de la frataxina humana para conseguir el YAC clon 1(38), el cual fue utilizado para generar el ratón transgénico YG8.....	56
Figura 18. Representación del modelo de datos de censura tipo I a la derecha en el análisis de supervivencia.....	59

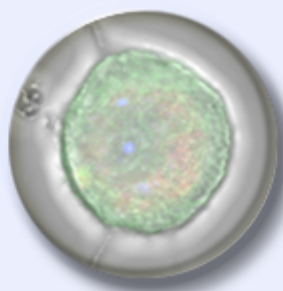
Figura 19. Ilustración esquemática de un aparato rotarod estándar para testar la coordinación motora.	60
Figura 20. Ilustración esquemática de un montaje de la barra de equilibrio para testar la coordinación motora.	61
Figura 21. Imagen que representa las partes de la prueba del palo.	62
Figura 22. Esquema de la estrategia para el aislamiento de las neuronas propioceptivas del resto de neuronas sensitivas del ganglio dorsal.	65
Figura 23. Cambios en la morfología mitocondrial cuando se hincha sin cambios en la superficie o área mitocondrial.	72
Figura 24. Aislamiento de la subpoblación de neuronas propioceptivas del ganglio dorsal.	78
Figura 25. Patrones de expresión diferencial de las proteínas seleccionadas como candidatas a marcadores de propioceptivas.	80
Figura 26. Genotipado y fenotipado del modelo murino FRDA.	83
Figura 27. Inmunodetección por WB de frataxina humana en columnas posteriores del ratón FRDA.	84
Figura 28. Peso corporal en el modelo murino FRDA.	85
Figura 29. Curvas de supervivencia del modelo murino FRDA.	86
Figura 30. Prueba del ROTAROD en el modelo murino FRDA.	88
Figura 31. Prueba de la barra de equilibrio en el modelo murino FRDA.	90
Figura 32. Prueba del palo en el modelo murino FRDA.	91
Figura 33. Expresión diferencial de frataxina en tejidos neuronales del modelo murino FRDA.	93
Figura 34. Estudio de las vías de neurodegeneración en tejidos neuronales del modelo murino FRDA.	95
Figura 35. Detección de la FXN humana en el cultivo primario de neuronas sensitivas del ganglio dorsal en el modelo murino FRDA.	98
Figura 36. Frecuencia de tamaños de las áreas de los somas neuronales en el modelo murino FRDA.	100
Figura 37. Frecuencia de tamaños de los diámetros de los somas neuronales en el modelo murino FRDA.	101
Figura 38. Detección de la distribución mitocondrial axonal en el modelo murino FRDA.	103

Figura 39. Identificación de los tipos de neuronas sensitivas con formación de esferoides axonales en el modelo murino FRDA.	104
Figura 40. Detección de proteínas mitocondriales en los esferoides axonales en el modelo murino FRDA.	106
Figura 41. Detección de proteínas de microtúbulos en los esferoides axonales en el modelo murino FRDA.	108
Figura 42. Detección de proteínas de neurofilamentos en los esferoides axonales en el modelo murino FRDA.	109
Figura 43. Detección de neurofilamento intermedio en los esferoides axonales en el modelo murino FRDA.	110
Figura 44. Detección de proteínas de vesículas de transporte en los esferoides axonales en el modelo murino FRDA.	112
Figura 45. Detección de proteínas de autofagia en los esferoides axonales en el modelo murino FRDA.	115
Figura 46. Ultraestructura de la neurona sensitiva en cultivo primario en el modelo murino FRDA.	117
Figura 47. Detección del $\Delta\psi_m$ mediante la sonda JC-1 en neuronas sensitivas del modelo murino FRDA.	119
Figura 48. Detección del $O_2^{\bullet-}$ mediante la sonda MitoSOX en neuronas sensitivas del modelo murino FRDA.	122
Figura 49. Detección del calcio intracelular mediante la sonda Fura-2 en neuronas sensitivas <i>in vivo</i> del modelo murino FRDA.	126
Figura 50. Patrón de la red neurítica y mitocondrial en neuronas sensitivas del modelo murino FRDA.	130
Figura 51. Cuantificación de los descriptores de la morfología mitocondrial en neuronas sensitivas del modelo murino FRDA.	133
Figura 52. Diferencias en la composición de proteínas en el ganglio dorsal del modelo murino FRDA.	135
Figura 53. Representación de las funciones moleculares de las proteínas expresadas diferencialmente en el ratón YG8R.	136
Figura 54. Vía de la fosforilación oxidativa según la base de datos KEGG.	137

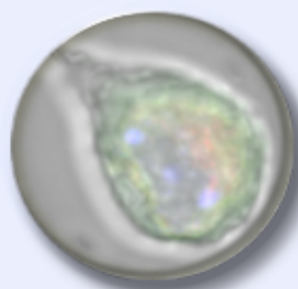
Figura 55. Vía de la señalización por calcio según la base de datos KEGG.....	141
Figura 56. Vías de señalización mediadas por el receptor PAC1R, que aparecen defectuosas en el modelo murino FRDA.	144
Figura 57. Detección de la actividad calpaína en neurona sensitiva <i>in vivo</i> del modelo murino FRDA.	149
Figura 58. Detección de la actividad calpaína en neuronas sensitivas <i>in vivo</i> del modelo murino FRDA con tratamientos moduladores de su actividad.....	153
Figura 59. Patrón de la red neurítica y mitocondrial en neuronas sensitivas del modelo murino FRDA tratadas con moduladores del calcio y de la actividad calpaína.	155
Figura 60. Cuantificación de los descriptores de la morfología mitocondrial en neuronas sensitivas del modelo murino FRDA tratadas con moduladores del calcio y de la actividad calpaína.....	157
Figura 61. Detección de los niveles de Ca^{2+} citosólico en neurona sensitiva <i>in vivo</i> del modelo murino FRDA.	161
Figura 62. Detección de los niveles de Ca^{2+} citosólico en neuronas sensitivas <i>in vivo</i> del modelo murino FRDA con inhibidores de PDE.	163
Figura 63. Patrón de la red neurítica y mitocondrial en neuronas sensitivas del modelo murino FRDA tratadas con inhibidores de PDE.....	165
Figura 64. Cuantificación de los descriptores de la morfología mitocondrial en neuronas sensitivas del modelo murino FRDA tratadas con inhibidores de PDE.....	167

Índice de tablas

Tabla 1. Anticuerpos primarios empleados.	52
Tabla 2. Anticuerpos secundarios empleados.	53
Tabla 3. Sondas y tinciones empleadas.	54
Tabla 4. Reactivos y volúmenes utilizados en las PCR.	56
Tabla 5. Programas del termociclador utilizados en las PCR.	56
Tabla 6. Reactivos y volúmenes utilizados en la PCR a tiempo real para la amplificación y cuantificación del transgén YG8.	57
Tabla 7. Programa del termociclador para la amplificación del transgén YG8 por PCR cuantitativa.	57
Tabla 8. Oligonucleótidos empleados.	57
Tabla 9. Parámetros morfológicos mitocondriales analizados mediante microscopía de fluorescencia.	71
Tabla 10. Expresión diferencial de mRNA asociado a la población propioceptiva.	79
Tabla 11. Listado de la identificación de las proteínas diferencialmente expresadas en el ratón YG8R relacionadas con los procesos celulares de la CTE, OXPHOS y sistemas antioxidantes celulares.	138
Tabla 12. Listado de la identificación de las proteínas diferencialmente expresadas en el ratón YG8R relacionadas con la señalización celular de GPCR y de calcio.	143
Tabla 13. Listado de la identificación de las proteínas diferencialmente expresadas en el ratón YG8R relacionadas con la señalización celular por calcio.	145



INTRODUCCIÓN



1. La ataxia de Friedreich (FRDA)

En 1863, Nicholas Friedreich describió una nueva enfermedad que se reconoce con el nombre de ataxia de Friedreich (FRDA; OMIM #229300; ORPHA95). FRDA es la forma clínica, de inicio precoz, más frecuente de las ataxias espinocerebelosas hereditarias [1]. Se ha estimado una prevalencia de 4,7 casos por 100.000 habitantes en la población española [2].

Es una enfermedad neurodegenerativa con afectación de las vías propioceptivas en el sistema nervioso periférico (SNP), la médula espinal y el núcleo dentado del cerebelo en el sistema nervioso central (SNC). Los primeros cambios patológicos aparecen en el ganglio de la raíz dorsal y el nervio periférico, con la pérdida de los axones mielinizados de las neuronas sensitivas grandes, seguidos de la atrofia de los cordones posteriores y de los tractos espinocerebelosos y corticoespinales de la médula espinal (**Figura 1**). Estos cambios se acompañan de pérdida distal progresiva de las fibras mielínicas de gran diámetro en los nervios periféricos encargados de la sensibilidad profunda, que condiciona la ataxia en la marcha, y de una degeneración de los tractos piramidales de la médula espinal, especialmente de la zona lumbar, que provocan debilidad muscular en las extremidades inferiores y se acompaña de pérdida de los reflejos osteotendinosos y posteriormente aparece disartria, atrofia óptica, nistagmus y escoliosis.

La axonopatía ha sido asociada con un mecanismo *dying-back* por las evidencias de pérdida de fibras distales en el nervio periférico sural. En la patogénesis de las lesiones del ganglio dorsal, en las raíces dorsales y en los nervios periféricos sensitivos, ocurren en combinación dos procesos: los defectos en el desarrollo y la atrofia [3]. Los estudios patológicos recientes en biopsias del nervio sural sugieren que las células de Schwann también están implicadas en la hipomielinización de las fibras mielínicas [4]. Por lo que la mejor interpretación de la patogénesis de la neuropatía sensitiva en la FRDA es la combinación de un retraso en el desarrollo o hipoplasia, una mielinización ineficiente y una axonopatía progresiva lentamente superpuesta [5].

Este proceso neurodegenerativo evoluciona hacia una invalidez sin remisión que confina al paciente a una silla de ruedas unos 15 años después del inicio de la sintomatología. Un alto porcentaje de los pacientes sufre miocardiopatía hipertrófica, fibrosis miocárdica y fallo cardíaco, que suele ser la causa de mortalidad. Un 30% de los pacientes desarrollan intolerancia a los hidratos de carbono y un 10% diabetes mellitus [6, 7].

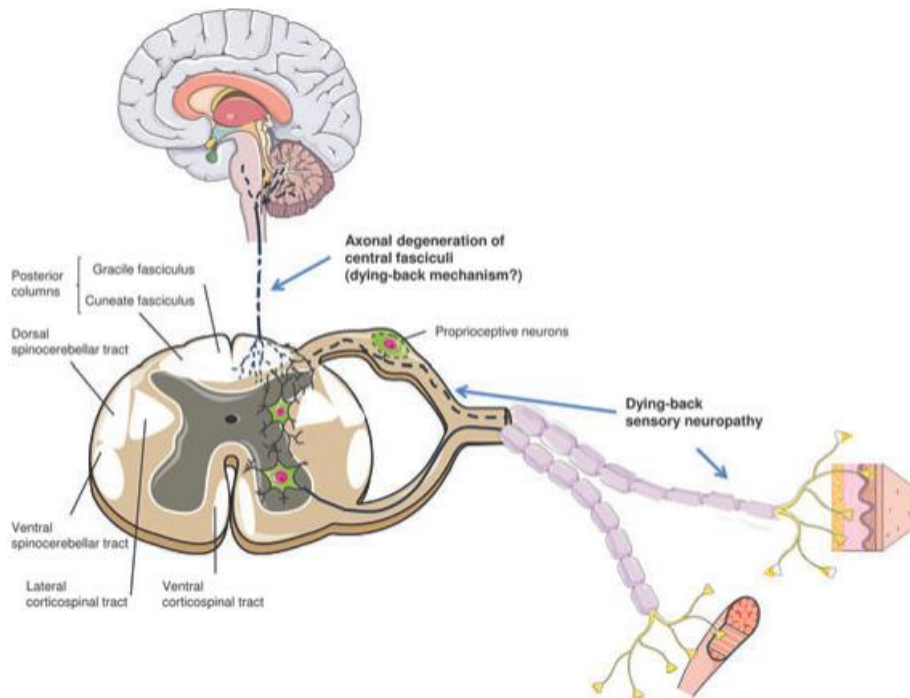


Figura 1. Dibujo esquemático de la patología axonal en el SNP y SNC.

La neuropatía axonal sensitiva *dying-back* se representa por pérdida de los axones mielinizados grandes (línea discontinua negra) y la mielinización anormal (pérdida de la línea negra en la mielina) en asociación con la pérdida de las neuronas propioceptivas grandes en el ganglio dorsal. La implicación de los axones centrales en la médula espinal se representa por las conexiones anormales de las dendritas en el lemnisco medial (líneas negras discontinuas). La degeneración de los tractos y los fascículos se representan en blanco. Las motoneuronas, interneuronas y los axones motores nerviosos y la mielina son normales. Adaptado de Gonzalez-Cabo y Palau (2013) [4].

La FRDA se hereda con un patrón autosómico recesivo, siendo responsable el gen *FXN*, localizado en el cromosoma 9q13, que codifica una proteína de 210 aminoácidos asociada a la membrana mitocondrial interna (MMI) llamada frataxina (FXN). La expansión de la repetición del triplete GAA, en un número variable de 100-1700, asociada con cambios epigenéticos en el intrón 1 del gen *FXN* provoca una disminución de la transcripción del mRNA y de los niveles de proteína frataxina en todos los tejidos. La gravedad y la edad de inicio de la enfermedad es inversamente proporcional al número de repeticiones [8].

La proteína frataxina presenta tres isoformas FXNI, FXNII y FXNIII. La FXNI es la primera que se describió, es la más abundante y a la que se le atribuyen todas las funciones mitocondriales. Se sintetiza como un precursor de 30 KDa en el citosol y es dirigido a la mitocondria donde las peptidasas mitocondriales lo cortan a un intermediario de 19 KDa y tres formas maduras de 17, 14,5 y 14,2 KDa [8, 9]. La isoforma FXNII se genera a partir de un sitio de inicio de la transcripción diferente y se

localiza en el citosol y la FXNIII se genera por procesamiento alternativo del mRNA y se localiza en el núcleo [10]. De las dos isoformas más recientes, la FXNII es más abundante en tejidos nerviosos y la FXNIII está más presente en el corazón. Se desconoce la función de estas isoformas alternativas y su implicación en la patogénesis de la FRDA, aunque se ha descrito que la isoforma citosólica FXNII promueve la supervivencia celular [11].

La frataxina está implicada en distintos procesos celulares como respuesta al estrés oxidativo [12-18], almacenamiento de hierro [19-21], biogénesis de los centros Fe-S (ISC, *iron sulfur clusters*) [22-26], activación de la aconitasa [27] y producción energética de la célula [15, 28-30]. A pesar de toda la información disponible, no se comprenden todavía bien el papel de frataxina y los mecanismos moleculares subyacentes a la FRDA. Sobre todo, cómo su déficit afecta a la supervivencia celular y cómo puede producir neurodegeneración.

La hipótesis de la biogénesis de ISC es la más aceptada con respecto a la función bioquímica de la frataxina. Frataxina actúa como una chaperona de hierro mitocondrial que almacena y suporta el hierro en una forma biodisponible para la biosíntesis de centros Fe-S y grupos hemo [31]. La consecuencia de la deficiencia de frataxina es el fallo del ensamblaje de los centros Fe-S, que resulta en una sobrecarga celular de hierro y una función anormal de las actividades enzimáticas de los complejos de la cadena de transporte de electrones (CTE), con el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa (OXPHOS, *oxidative phosphorylation system*) y producción de especies reactivas del oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*). Los depósitos de hierro asociados a la producción de ROS se han observado en modelos animales y celulares de déficit de frataxina y en biopsias de pacientes.

Sin embargo, otras funciones de la frataxina también son importantes para la fisiopatología, como su interacción directa con el complejo II de la CTE, que enlaza directamente el déficit de frataxina con una desorganización de la CTE y un defecto en la respiración mitocondrial [30]. Este fallo mitocondrial que causa la depleción de frataxina se transmite a la célula que responde estimulando la biogénesis mitocondrial, cuando el déficit de frataxina no es muy grave [17], y activando la autofagia como mecanismo de defensa frente al daño oxidativo [18]. El daño oxidativo puede llegar a activar la muerte neuronal por apoptosis y afectar a la viabilidad y proliferación celular, dependiendo del modelo en el que se estudie [4]. Con respecto a la proliferación se ha observado un enlentecimiento en el crecimiento asociado a senescencia celular [18].

En el déficit de frataxina también aparecen alterados otros procesos celulares como la dinámica mitocondrial, la homeostasis del calcio y la afectación del citoesqueleto. Con respecto a la dinámica mitocondrial se ha visto que la mitocondria puede aparecer fusionada [18] o fisionada [32], según el modelo de estudio. Con respecto a la homeostasis del calcio, se ha confirmado que un déficit de frataxina disminuye la capacidad de carga del calcio por la mitocondria [18], mientras que la sobreexpresión de frataxina la aumenta [29]. En fibroblastos de pacientes se ha observado que el déficit de frataxina desestabiliza la estructura del citoesqueleto, posiblemente a

través del estrés oxidativo [33, 34]. En biopsias medulares de pacientes se encontró un aumento de la tubulina dinámica respecto a la estable, implicando una alteración de la polimerización de los microtúbulos y por lo tanto de la red del citoesqueleto en FRDA [35].

1.1. Modelos animales de FRDA.

Los modelos animales de FRDA son fundamentales para entender los mecanismos de la enfermedad. Intentar reproducir la fisiopatología de los pacientes es esencial para la investigación de potenciales estrategias terapéuticas. Muchos modelos han sido desarrollados en la FRDA pero ninguno ha conseguido reproducir, en su conjunto, la progresión de los síntomas en cada uno de los tejidos específicos, ni ha conseguido implicar a todos los mecanismos celulares alterados en la enfermedad.

El primer modelo murino que se creó fue el ratón *knockout* para el gen murino de FRDA (*Fxn*^{-/-}), con la delección total de la frataxina. Este ratón presentaba letalidad embrionaria en el día E6.5, demostrando el papel esencial que ejerce la frataxina en el desarrollo embrionario temprano [36].

Para superar esta letalidad embrionaria y poder conocer las consecuencias de la depleción de frataxina tras el desarrollo embrionario se desarrollaron modelos *knockout* condicionales específicos de tejido, con el sistema Cre-LoxP y con los promotores MCK (*muscle creatine kinase*) y NSE (*neuron specific enolase*). Son condicionales porque este sistema permite deleccionar la frataxina a la edad que se desee y son tejido específicos porque deleciona la frataxina en los tejidos que expresen los promotores elegidos. En estos modelos se eligió deleccionar la frataxina en los mismos tejidos afectados en los pacientes como son el corazón y el sistema nervioso [37]. Estos ratones reproducen las características fisiopatológicas y bioquímicas más importantes de la enfermedad humana, como hipertrofia cardíaca y ataxia progresiva específica con pérdida de la propiocepción, pero presentan inconvenientes como la excesiva agresividad y presencia de signos no específicos de la FRDA en el modelo neuronal NSE. Para conseguir un buen modelo en sistema nervioso se generó un nuevo modelo *knockout* condicional inducible con el sistema Cre-LoxP bajo el promotor PRP (*prion protein*). En este caso se induce la delección de frataxina con la administración de tamoxifeno, que trasloca al núcleo la Cre recombinasa y deleciona el exón 4 de la frataxina, de forma tejido específica, en ganglio dorsal, médula espinal y cerebelo. Este modelo presenta ataxia mixta cerebelar y sensitiva con pérdida de propiocepción, pero también otros signos no característicos de la FRDA [38].

Viendo que la pérdida total de frataxina no reproducía la patología de la enfermedad se desarrollaron modelos con una cantidad mínima de frataxina basados en la expansión de la repetición del trinucleótido GAA. En el modelo KIKI se introdujo la expansión (GAA)₂₃₀ en el primer intrón del locus de la frataxina murina en homocigosis y después se cruzó con el *knockout* completo de la frataxina murina para obtener un modelo en heterocigosis llamado KIKO [39]. El ratón KIKI y KIKO presentan

un 66-83% y un 25-36% en la expresión de la proteína frataxina comparado con el control, respectivamente. Pero el ratón KIKO no presentó fenotipo cardíaco o neurológico, debido posiblemente a que supera el umbral de expresión de frataxina patológico que es del 25%. Otra posibilidad es el papel que juegue el contexto genómico en la enfermedad en el humano y que no se reproduce en el ratón.

Hay que tener en cuenta que únicamente un 2% de los pacientes presentan mutaciones puntuales que provoquen un cambio en la pauta de lectura o un codón stop prematuro. Estas mutaciones además nunca están presentes en homocigosis. El hecho de que el 98% de los pacientes de FRDA sea una mutación dinámica hace que sea complicado reproducir un contexto genómico parecido en los modelos murinos. Con los modelos condicionales, descritos anteriormente, se pierde completamente el contexto genómico, por lo que para solventar este problema se generaron modelos basados en la expansión de la repetición del trinucleótido GAA. Estos modelos transgénicos son el YG8 e YG22, en los que se introdujo un YAC que contenía en el primer intrón del gen de FXN humana las expansiones (GAA)₉₀₊₁₉₀ y (GAA)₁₉₀, respectivamente [40], y se cruzaron con el *knockout* completo de frataxina murina para rescatarlo y obtener los modelos YG8R e YG22R [14]. Estos ratones rescatados exhiben un fenotipo progresivo leve, con ligero impedimento en la coordinación y defectos locomotores, una moderada degeneración de las neuronas sensitivas grandes del ganglio dorsal con vacuolas, cromatolisis y acúmulos de lipofucsina, una disminución de la actividad aconitasa y ligeros signos de estrés oxidativo. La presencia de las repeticiones GAA en la misma posición intrónica y el mismo contexto genómico que presentan los pacientes humanos en el transgén YG8, impide la correcta transcripción de la frataxina humana obteniendo cantidades reducidas de frataxina humana, pero suficientes para “rescatar” la letalidad embrionaria en el estadio E6.5, que presenta el ratón deficiente en frataxina murina.

En el caso de los modelos animales basados en las repeticiones de la expansión GAA, hay que tener en cuenta que dichas repeticiones son artificiales, ya que únicamente están presentes en los humanos. Posiblemente, el fenotipo moderado que presentan se deba a que el umbral de repeticiones necesarias para desarrollar sintomatología en los ratones es distinto al del humano [41].

1.2. Terapias actuales en la FRDA

La FRDA no tiene tratamiento que altere la historia natural de la enfermedad neurológica. Es una enfermedad neurodegenerativa progresiva debilitante asociada con miocardiopatía y diabetes. La causa que subyace es una deficiencia de la proteína mitocondrial frataxina que causa depósitos de hierro mitocondriales, aumento del estrés oxidativo e impedimento de la producción de ATP. Por todo ello los principales tratamientos y estrategias terapéuticas en FRDA se pueden dividir en cuatro categorías: tratamientos paliativos y sintomáticos, quelantes del hierro, antioxidantes y modificadores de los niveles de frataxina.

Los tratamientos paliativos consisten en el uso de la silla de ruedas, β -bloqueantes, inhibidores de la acetilcolinesterasa, cirugía para las manifestaciones cardíacas y

fisioterapia. Las patologías asociadas que aparecen como la miocardiopatía y la diabetes se tratan con los tratamientos indicados para cada una de estas patologías [42].

1.2.1. Antioxidantes

La disminución del estrés oxidativo ha sido uno de los puntos principales de actuación en la FRDA. En los últimos 15 años diversos ensayos clínicos han valorado la eficacia de los agentes antioxidantes en esta enfermedad, sin embargo la respuesta sobre su eficacia continúa sin contestarse. El tratamiento con antioxidantes como coenzima Q (CoQ), vitamina E, idebenona o su combinación ha sido utilizado para prevenir el daño mitocondrial y preservar la respiración mitocondrial.

La Coenzima Q₁₀ (CoQ₁₀) es un antioxidante con gran habilidad para facilitar la transferencia de electrones a través de la CTE y por tanto para incrementar la producción de ATP. La asociación CoQ₁₀ y vitamina E fue incluida en varios ensayos clínicos en los que se concluyó que los pacientes tratados no presentaron mejoras en la función neurológica. El tratamiento no modificaba, pero tampoco empeoraba la puntuación ICARS (*International Cooperative Ataxia Rating Scale*) de los pacientes. Sin embargo en estos estudios clínicos se pudo diferenciar dos grupos de pacientes, uno con respuesta a los tratamientos antioxidantes que mejoran la puntuación ICARS, y otro grupo de pacientes que no respondían porque no mejoran esta puntuación. Además se pudo confirmar que los pacientes que sí mejoraban la puntuación ICARS presentaban menores niveles séricos de CoQ₁₀, indicando que este puede ser un predictor de la respuesta a la terapia antioxidante [43].

La idebenona es un análogo estructural del CoQ₁₀, con mayor biodisponibilidad, que mejora los marcadores intracelulares de estrés oxidativo y los síntomas de la FRDA en modelo celular y murino. Los primeros ensayos clínicos fueron muy prometedores porque la idebenona disminuía los síntomas neurológicos, disminuía el estrés oxidativo, la peroxidación lipídica y enlentecía la progresión de la enfermedad cardíaca. Fue el primer principio activo en llegar a la fase III del ensayo clínico, pero no superó esta fase clínica porque no se encontraron mejorías significativas en la esperanza de vida o en la mejora de la función cardíaca de los pacientes [42].

La falta de significación en los resultados de los ensayos clínicos no debe entenderse como que los antioxidantes o los modificadores de la CTE no sean buenos agentes potencialmente terapéuticos [42]. Hay que tener en cuenta que debido a la lenta progresión de la enfermedad cualquier mejora por mínima que sea es muy difícil de poner en evidencia. Además habría que estratificar a los pacientes de los ensayos clínicos considerando la edad de inicio, la duración de la enfermedad y el nivel de discapacidad. La búsqueda de marcadores clínicos y biológicos que permitan diferenciar entre los pacientes que responden al tratamiento antioxidante y los que no, permitiría la prescripción de estas terapias de una forma efectiva, y además ayudaría en el estudio de los mecanismos patológicos de la enfermedad [43].

1.2.2. Quelantes del hierro

La toxicidad del hierro ha priorizado la eliminación de los depósitos de este metal presentes en los pacientes. Para su eliminación se han utilizado quelantes del hierro con capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica como la deferiprona. Los resultados clínicos de este agente quelante son contradictorios. Por una parte se ha visto que disminuye el daño de las proteínas mitocondriales por ROS y que disminuye los acúmulos de hierro en el cerebro presentando una pequeña, pero significativa, mejora de la función neurológica con la disminución de la puntuación ICARS [44]. Sin embargo reduce la actividad aconitasa, haciéndola poco recomendable para el tratamiento de la FRDA. La deferoxamina es otro quelante del hierro que también reducía el mRNA de la aconitasa y el de la frataxina, lo que la descartaba completamente como posible tratamiento [42].

1.2.3. Modificadores de los niveles de frataxina

Los modificadores de los niveles de frataxina intentan aumentar los contenidos intracelulares de frataxina para prevenir la cascada de la disfunción proteica y el daño mediado por ROS. Algunos de estos compuestos han sido usados para combatir el silenciamiento del gen FXN y aumentar los niveles de frataxina.

Los inhibidores de las enzimas deacetilasas de histonas (HDAC) activan una conformación de la cromatina que permite restaurar la función normal de los genes que están silenciados. Los inhibidores de HDAC han tenido un modesto éxito en linfocitos y en modelos murinos de FRDA [42]. Actualmente se encuentra en fase preclínica el compuesto 109/RG2833 para determinar si aumenta de una forma segura los niveles de frataxina en monocitos de sangre periférica en pacientes de FRDA [45]. Otro inhibidor de HDAC que remodela la heterocromatina patológica y aumenta la expresión de frataxina es la nicotinamida o vitamina B3. Un reciente estudio en pacientes ha demostrado que la nicotinamida mejora las concentraciones de frataxina en 8 semanas de tratamiento pero no muestra cambios en las medidas clínicas [46].

La eritropoyetina (EPO) *in vitro* aumenta los niveles de proteína frataxina en fibroblastos humanos, sin aumentar el mRNA, por lo que tiene un efecto a nivel postranscripcional promocionando la traducción del mRNA de la frataxina en proteína [42]. La eficacia y la seguridad del uso de EPO y derivados en las enfermedades neurológicas, como en la FRDA, son inconsistentes y el mecanismo exacto de acción de la EPO en la neuroprotección permanece sin comprenderse. Los ensayos clínicos en pacientes de FRDA indican que el aumento de frataxina es contradictorio, señalando que la EPO no debería considerarse como un tratamiento para los pacientes de Friedreich [47].

1.2.4. Nuevas estrategias terapéuticas

Actualmente están en estudio distintas estrategias terapéuticas para descubrir o desarrollar nuevas terapias potenciales en FRDA. FARA (Friedreich's Ataxia Research Alliance) presenta el resumen de las actuaciones terapéuticas en fase clínica o en desarrollo agrupadas por campos de actuación (**Figura 2**).

1.2.4.1. Disminución del estrés oxidativo y/o aumento de la función mitocondrial

Están en fase de ensayo clínico en pacientes el EPI743, que favorece el acoplamiento de la producción de energía en la mitocondria para disminuir el estrés oxidativo, el OX1 (ácido indol-3-propiónico) previene el estrés oxidativo por secuestrar los radicales libres y quelar metales y el RTA408, que es un activador de factor de transcripción Nrf2. La vía Nrf2 se activa para proteger frente a la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo, sin embargo en pacientes de FRDA se ha visto una disminución de Nrf2, por lo que su activación podría mejorar la función mitocondrial. Dentro de este grupo hay compuestos en fase de investigación preclínica como los ácidos grasos poliinsaturados deuterizados (dPUFAs) o los neutralizadores (*quenchers*) de radicales mitocondriales (MRQs). La deuterización de los ácidos grasos evita su oxidación por los radicales libres y favorece su incorporación a las membranas mitocondriales para mejorar la función mitocondrial. Los neutralizadores de radicales mitocondriales mejoran múltiples funciones mitocondriales y se están testando en modelos celulares y animales de FRDA.

1.2.4.2. Modulación de las vías metabólicas controladas por frataxina con aproximaciones nutricionales

Están en fase de ensayo clínico en pacientes los análogos de la hormona incretina, que controla los niveles de glucemia. Este grupo farmacológico se desarrolló para el tratamiento de la diabetes tipo II pero se ha visto que también aumentan la expresión de frataxina en las células β -pancreáticas y ahora se quiere estudiar si son efectivos en la protección neuronal. También en ensayo clínico están el resveratrol, que mejora la función mitocondrial y aumenta los niveles de frataxina, y la acetil-L-carnitina que facilita el transporte de los ácidos grasos al interior de la mitocondria para su degradación. En investigación preclínica se encuentra el dimetilfumurato como activador de Nrf2, y las aproximaciones nutricionales que activan PGC1 α , para modular la expresión de genes implicados en el metabolismo energético y mejorar la función mitocondrial.

1.2.4.3. Estabilización, promoción y reemplazo de frataxina

Dentro de este grupo ya hemos visto compuestos como la eritropoyetina (EPO) y sus compuestos miméticos que aumenta la transcripción génica de frataxina, y que se encuentra en fase clínica II. En estudio preclínico encontramos otras estrategias para restaurar los niveles de frataxina como los competidores de la ubiquitina que evitan la degradación de la frataxina por el proteasoma, o la terapia sustitutiva con una frataxina sintética vía TAT (*Trans-Activator of Transcription*), que la dirige a la

mitocondria. Otras proteínas de fusión, similares a la frataxina-TAT, se están probando para la terapia sustitutiva.

1.2.4.4. Aumento de la expresión del gen frataxina

Ya hemos visto los inhibidores de los HDAC, como nicotinamida y RG2833, que están en fases clínicas de ensayo en humanos avanzadas. Otro tratamiento en ensayo clínico es el interferón gamma (IFN- γ), que es un fármaco utilizado en otras enfermedades raras y que se confirmó que aumenta los niveles del mRNA y de la proteína frataxina en modelos celulares y animales de FRDA. A nivel de estudio preclínico continúa la búsqueda de actuaciones basadas en el RNA y en la epigenética para conseguir aumentar la transcripción de la frataxina.

1.2.4.5. La terapia génica de sustitución con vectores víricos o con nanopartículas

Éste grupo terapéutico que todavía se encuentra en fase preclínica, pero muy prometedor, que se espera puedan dirigir el reemplazamiento de la frataxina en tejidos específicos como el cardíaco y el sistema nervioso.

1.2.4.6. Búsqueda de nuevos compuestos

Búsqueda en grandes bibliotecas, de cientos o miles, de compuestos químicos permite el descubrimiento de nuevos candidatos terapéuticos valorando su actividad con ensayos de función mitocondrial o aumento de la expresión de frataxina.

Se conoce perfectamente el mecanismo que regula la expresión del gen *FXN*, que la expansión de las repeticiones GAA provoca el silenciamiento y que la principal función de la frataxina es la síntesis de centros Fe-S. Sin embargo, no se encuentra un tratamiento efectivo que pare la progresión de la enfermedad. Una de las razones puede ser que nuestros conocimientos de la fisiología de las células deficientes y en particular de las neuronas afectadas por la enfermedad son reducidas todavía. Un largo número de estudios muestran que las células deficientes en frataxina presentan numerosos fenotipos pleiotrópicos secundarios, que surgen del déficit de centros Fe-S, como la disfunción mitocondrial, la perturbación de la homeostasis del hierro, el daño del DNA y la mutagénesis y el estrés oxidativo. Sin embargo otras áreas de investigación relevantes en la patología de la enfermedad y fundamentales para la supervivencia neuronal están siendo poco estudiadas, como el transporte y la dinámica mitocondrial, la homeostasis del calcio, la señalización por óxido nítrico y la inflamación [48]. El estudio de estos procesos neuronales en el déficit de frataxina ayudaría a entender mejor el mecanismo molecular patológico y aportaría nuevas ventanas terapéuticas para el tratamiento de la FRDA.

FA TREATMENT PIPELINE – AUGUST 2015

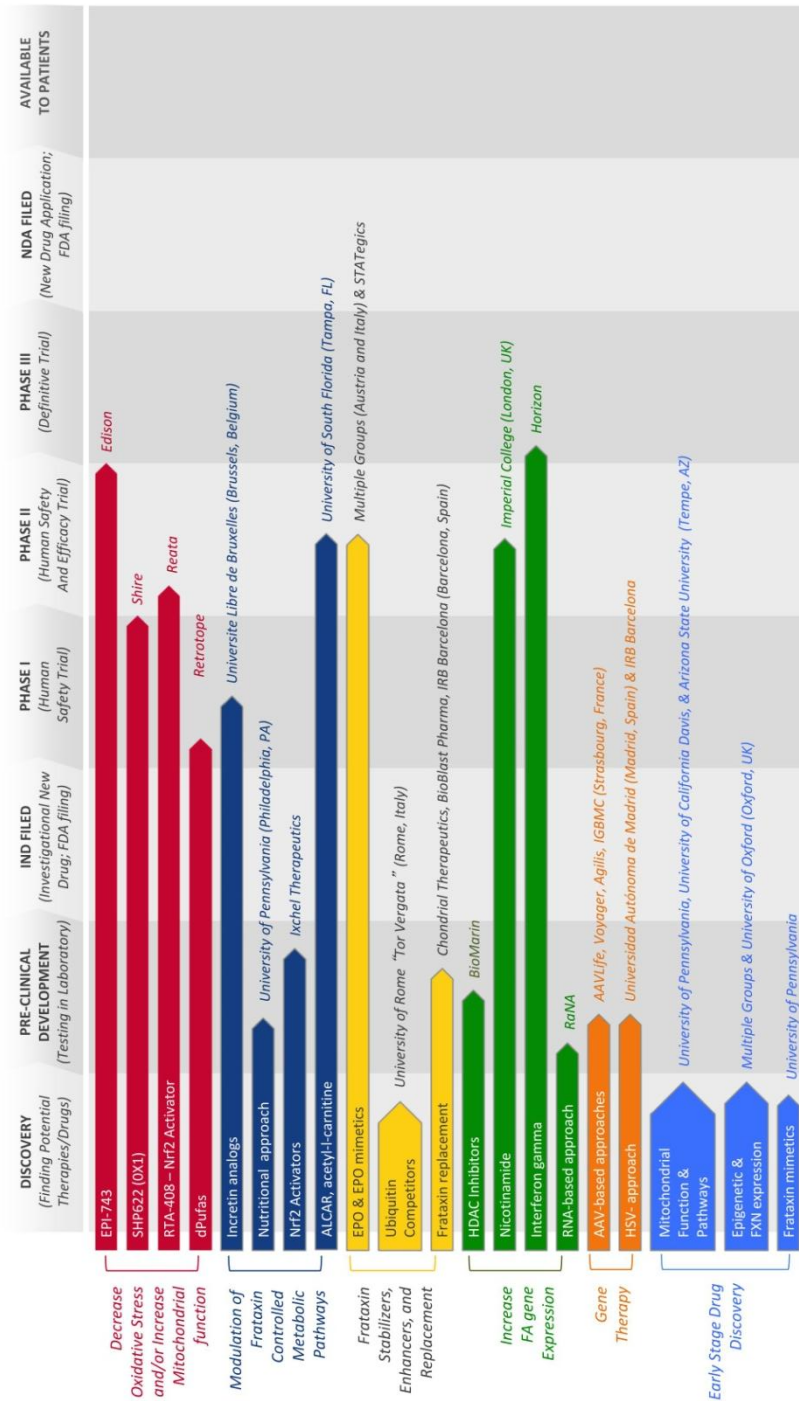


Figura 2. Progreso de la investigación y el desarrollo de nuevos compuestos terapéuticos.

El eje vertical muestra los candidatos agrupados según el mecanismo de acción o por aproximación terapéutica, p.ej. por la localización o el mecanismo de cada compuesto en la célula, aproximación tecnológica, o problema que está siendo abordado. En el eje horizontal se indica el estado de la investigación y dónde se están desarrollando los candidatos. El estado IND (*Investigational New Drug*) es cuando se envía la petición a la FDA (*United States Food and Drug Administration*) para la aprobación de su uso en humanos. En la fase I los compuestos ya están disponibles para los pacientes a través de los ensayos clínicos. Adaptado de <http://www.curefa.org/pipeline.html> (2015).

2. Neuronas sensitivas periféricas y ganglio de la raíz dorsal

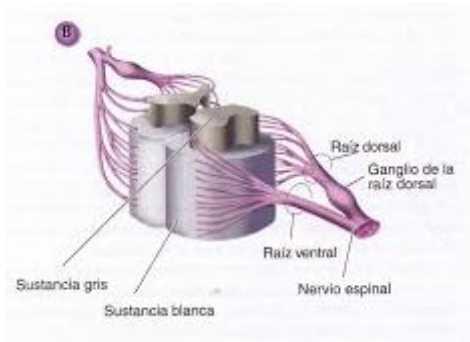
Los nervios periféricos (espinales o raquídeos) se prolongan desde la médula espinal y se distribuyen a las diferentes zonas del cuerpo. Existen 31 pares de nervios espinales: 7 cervicales, 12 torácicos, 5 lumbares, 5 sacras y 4 coccígeas.

Un nervio periférico tiene dos tipos de raíces nerviosas, las raíces dorsales o posteriores y las raíces ventrales, que salen desde cada segmento medular hasta su conjunción correspondiente para formar el nervio espinal o periférico (**Figura 3A**). Las raíces dorsales o posteriores recogen la información sensitiva, y en ellas se disponen los somas neuronales agrupados en el ganglio dorsal (espinal o raquídeo), que alojan los cuerpos de las neuronas de la vía aferente del SNP o núcleos de la primera neurona sensitiva (**Figura 3B**). Las raíces ventrales o anteriores recogen la información motora y el soma neuronal se localiza en el asta anterior de la médula, desde donde parte el axón por la raíz ventral y nervio periférico (**Figura 3A**).

En la FRDA el ganglio dorsal es el primer tejido en el que aparece neurodegeneración, afectando principalmente a las neuronas más grandes o propioceptivas. En biopsias de pacientes se ha encontrado que las neuronas sensitivas del ganglio dorsal son más pequeñas y aparecen nódulos residuales en los que han llegado a desaparecer neuronas. Además la raíz dorsal de los pacientes presenta axones muy finos y ausencia de los axones más gruesos. La raíz ventral en la FRDA es normal [5, 49]. Todo ello lleva a una pérdida distal progresiva de las fibras mielínicas de gran diámetro en los nervios periféricos.

El ganglio dorsal contiene una población heterogénea de neuronas sensitivas primarias que inervan diferentes dianas periféricas y transmiten diferentes tipos de información sensitiva al SNC (**Figura 3B**). La diversidad fenotípica de las neuronas sensitivas se establece durante el desarrollo prenatal y postnatal temprano por una activación secuencial de combinaciones de factores de transcripción y de factores de crecimiento que modulan la supervivencia neuronal y controlan la proporción final de cada uno de los tipos de neuronas sensitivas. A pesar de toda esta complejidad se acepta en general que las neuronas de tamaño pequeño están relacionadas con los diferentes tipos de nociceptores y median el daño y la temperatura. Las neuronas de tamaño intermedio inervan los mecanorreceptores periféricos y median el sentido del tacto, la presión y la vibración. Y finalmente, las neuronas más grandes son propioceptivas inervan los órganos sensitivos en los músculos y en las articulaciones, mediando el posicionamiento.

A)



B)

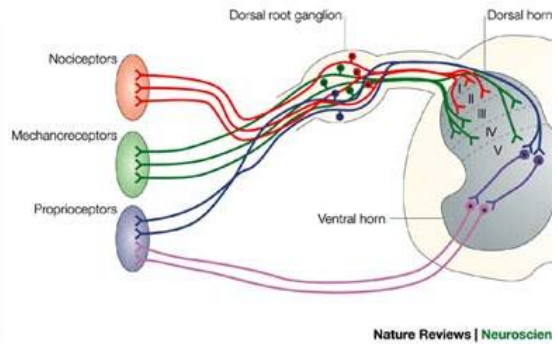


Figura 3. Nervio periférico y neuronas sensitivas del ganglio dorsal.

A) Segmento de la médula espinal en el que puede apreciarse la raíz dorsal que contiene el ganglio dorsal y la raíz ventral que salen de la médula espinal para unirse y formar el nervio periférico o espinal. **B)** Esquema de los circuitos neuronales en la médula espinal de un ratón embrionario de 18 días. Los axones de las neuronas sensitivas proyectan axones desde el ganglio dorsal en dos direcciones, hacia la lámina específica de la médula espinal y hacia los tejidos periféricos. El dolor y la temperatura son recogidos por las neuronas nociceptivas (rojas) y la información se integra en la lámina I y II. El tacto se recoge mediante los mecanorreceptores (verde) en los tejidos periféricos que conectan con la lámina III, IV y V. La propiocepción es mediada por las neuronas sensitivas (azul) que proyectan a través de la médula espinal con las neuronas motoras localizadas ventralmente. Las motoneuronas también conectan directamente con el músculo periférico para dirigir el movimiento (rosa). Los números romanos indican la lámina de la médula espinal. Adaptado de Caspary y Anderson (2003) [50].

La habilidad para percibir y discriminar los diversos tipos de sensación de cada una de las poblaciones de neuronas sensitivas especializadas se debe a que cada una responde a estímulos específicos. La relación entre los tipos de neurona y los estímulos físicos y químicos que subyacen en el tacto, el dolor, la temperatura y la propiocepción permanecen sin resolverse. Por ello no existe una clasificación objetiva de las distintas poblaciones basada en aspectos moleculares comprensibles. Los tipos de neuronas sensitivas se han caracterizado históricamente por el tamaño del soma (grande, intermedio y pequeño) y su aspecto (grandes-pálidas, intermedias y pequeñas-oscuras). Pero también se pueden clasificar según su aspecto estructural y ultraestructural (mielizadas o no mielinizadas, morfología del axón). O en función de sus propiedades fisiológicas (láminas de la médula espinal que inervan y tejidos diana a los que proyectan, velocidades de conducción de potenciales de acción). A partir de estas clasificaciones se han ido identificando marcadores moleculares específicos basados en aspectos más funcionales como el contenido de neuropéptidos y neurotransmisores, composición del citoesqueleto, composición de proteínas de unión a Ca^{2+} , expresión de canales iónicos o dependencia de los factores de crecimiento (**Figura 4**).

La clasificación más generalizada se basa en el tamaño, el tipo de sensación que recogen y en los receptores de factores de crecimiento o neuropéptidos que expresan. Con estos criterios las neuronas sensitivas se clasifican en cuatro grupos: grandes o propioceptivas, intermedias o mecanorreceptivas y pequeñas o nociceptivas, que a su vez se subdividen en peptidérgicas o no peptidérgicas (**Figura 4**).

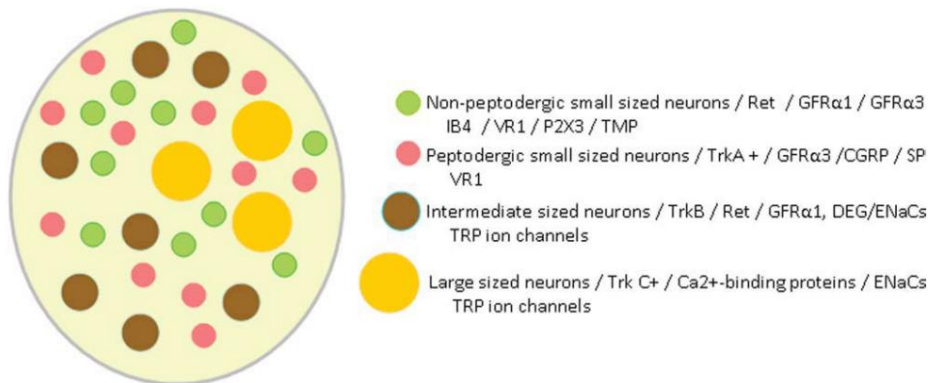


Figura 4. Esquema de la diversa población neuronal del ganglio dorsal y los parámetros para su clasificación.

En base al tamaño las neuronas sensitivas se clasifican en grandes, intermedias y pequeñas. En base al receptor de factor de crecimiento que expresan se clasifican en neuronas TrkC+ o propioceptivas, TrkB+ o mecanorreceptivas, TrkA+ o nociceptivas peptidérgicas y RET o nociceptivas no peptidérgicas. Algunas de estas poblaciones expresan receptores para otros factores de crecimiento como el receptor GFR α 1 en las mecanorreceptivas y nociceptivas no peptidérgicas y el GFR α 3 en las nociceptivas peptidérgicas. Las propioceptivas expresan específicamente la proteína de unión a Ca $^{2+}$ parvalbúmina. La población nociceptiva peptidérgica expresa neuropéptidos como la sustancia P (SP) o el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP, *calcitonin gene-related peptide*) y receptores de neurotransmisores como el receptor vaniloide subtipo 1 (VR1, *Vanilloid receptor 1*). La población nociceptiva no peptidérgica expresa receptores de neurotransmisores como el VR1 o el receptor purinérgico (P2X3, *ATP-gated ion channel purinoceptor subtype*) y se une a isolectina B4y contiene la enzima TMP, *thiamine monophosphatase*. Adaptado de Montano y colaboradores (2010) [51].

A finales de 2014, Usoskin y colaboradores publicaron un estudio transcriptómico en neuronas sensitivas de ganglio dorsal de ratón. En este caso los autores clasifican las neuronas sensitivas en 4 grupos básicos: neuronas grandes mielinizadas, nociceptores peptidérgicos, nociceptores no peptidérgicos y neuronas no mielinizadas. Y en función de los mRNA que expresan los ha subclasificado en 11 subtipos de neuronas sensitivas. De esta forma han identificado una nueva subpoblación neuronal en el ganglio dorsal relacionada con el picor y la sensibilización en la piel atópica [51, 52]. Por lo tanto, la identificación y clasificación de las subpoblaciones del ganglio dorsal continúa definiéndose cada vez más, hasta conocer todos los mecanismos moleculares que subyacen en cada una de las sensaciones que recogen las diferentes subpoblaciones de neuronas sensitivas.

El desarrollo y la supervivencia de las neuronas sensitivas periféricas son dependientes de las neurotrofinas y de sus receptores quinasa relacionados con tropomiosina (Trk, *tropomiosin-related kinase*). Según la teoría neurotrófica de Levi-Montalcini de 1987, las neurotrofinas son liberadas en el SNP por el tejido diana, se unen al receptor Trk específico en las terminaciones nerviosas y son internalizadas en vesículas membranosas que se transportan retrógradamente a lo largo del axón hasta el soma neuronal para transmitir la señal de supervivencia. La señalización Trk-neurotrofina promueve la supervivencia neuronal, la guía y el crecimiento axonal, la densidad de las inervaciones y la arborización en un amplio rango de subtipos neuronales diferentes. Y el déficit de neurotrofina promueve la degeneración axonal local y la eliminación axonal durante el desarrollo. Cada tipo de receptor Trk, a través de su neurotrofina específica, media la supervivencia de una subpoblación específica de neuronas periféricas, y la ausencia de una determinada neurotrofina o determinado Trk resulta en la pérdida de un conjunto neuronal definido [53, 54]. Las neuronas nociceptivas son dependientes de TrkA-NGF, las neuronas mecanorreceptoras de TrkB-BDNF y TrkB-NT4 y las neuronas propioceptoras de TrkC-NT3. Existen reacciones cruzadas y los receptores Trk pueden unir otras de las neurotrofinas no específicas, aunque con menor eficiencia en la activación, excepto el TrkC que sólo responde a la NT3. Las cuatro neurotrofinas activan también el receptor de neurotrofina pan p75 o p75NTR, un miembro de la superfamilia de receptores de factor de necrosis tumoral (**Figura 5**) [55-57].

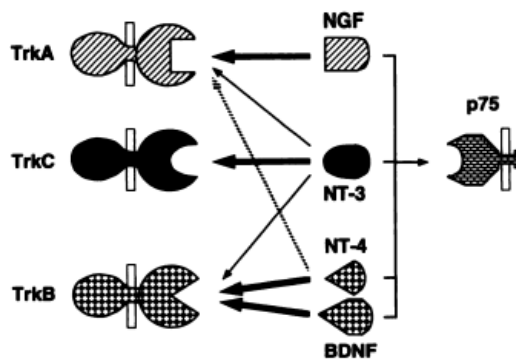


Figura 5. Interacciones entre las neurotrofinas y sus receptores.

Los Trk preferidos por cada una de las neurotrofinas se indican con la flecha ancha. Las reacciones cruzadas entre las neurotrofinas y los receptores Trk no preferidos se indican por flechas finas o punteadas. Las interacciones de las cuatro neurotrofinas con el receptor de baja afinidad p75 están agrupadas por el corchete. NGF, nerve growth factor o factor de crecimiento nervioso; NT-3, *neurotrophin 3*; NT-4, *neurotrophin 4*; BDNF, *brain-derived neurotrophic factor* o factor neurotrófico derivado de cerebro. Adaptado de Klein (1994) [55].

Los tres receptores Trk son una subfamilia de receptores tirosin quinasa (TK, *tyrosine kinases*). Su activación por la neurotrofina específica implica la dimerización y autofosforilación de quinasa presentes en su dominio citoplasmático. Esta fosforilación de tirosinas es seguida de la activación de diversas cascadas de señalización como las vías de PI3K/Akt, MAPK y PLCy. Estas vías de señalización intracelular modulan la expresión génica a través del factor de transcripción, regulado por Ca^{2+} , CREB (*cAMP response element binding*) o proteína de unión al elemento de respuesta al cAMP. La regulación génica se ejerce de forma específica al tipo celular y es responsable de la mayor parte de los efectos a largo plazo de las neurotrofinas relacionados con el crecimiento, la supervivencia y la diferenciación celular. Las neurotrofinas a través de todas estas cascadas de señalización además de regular el destino celular también regulan la expresión de proteínas como canales iónicos, enzimas biosintetizadores de neurotransmisores y neuropéptidos, todos ellos esenciales para la función neuronal normal. Por lo que niveles continuados de neurotrofinas son necesarios para la función sináptica, la plasticidad, la supervivencia neuronal y el mantenimiento de la morfología y la diferenciación neuronales a lo largo de toda la vida (**Figura 6**) [56, 58].

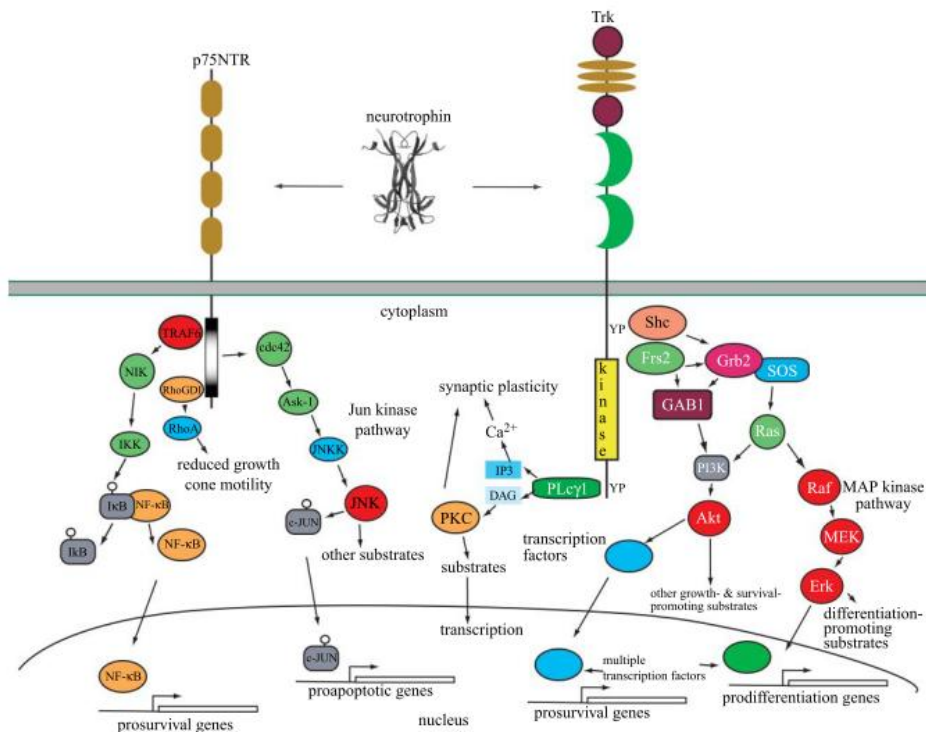


Figura 6. Interacción de neurotrofina con los receptores Trk y p75NTR y las vías de señalización activadas a través de cada uno de los receptores.

El receptor p75NTR regula tres grandes vías de señalización: i) la NF-κB, que activa la transcripción de genes para promover la supervivencia neuronal; ii) la Jun quinasa, que activa la transcripción de genes para promover la apoptosis neuronal, para ello se necesita la coactivación del receptor sortilina junto con

la del Trk por las neurotrofinas; iii) activación de Rho que controla la motilidad del cono de crecimiento. Los receptores Trk también regula tres grandes vía de señalización: i) la activación de Ras, que resulta en la activación de la cascada de señalización de las MAP quinasas y promueven la diferenciación neuronal y el crecimiento neurítico; ii) la activación de PI3 quinasa, que a través de Ras o Gab1 promueven la supervivencia y el crecimiento de las neuronas y de otras células; iii) la activación de PLC γ 1 que resulta en la movilización de Ca²⁺ celular y la activación de PKC para promover la plasticidad sináptica y la regulación de la transcripción génica. Adaptado de Reichardt (2006) [56].

Los receptores Trk también pueden ser transactivados en ausencia de neurotrofinas por los receptores acoplados a proteína G (GPCR, *G protein coupled receptor*). Es el caso de los ligandos adenosina y PACAP que, a través de sus receptores GPCR específicos, activan la fosforilación del receptor Trk, produciendo la activación de las vías PI3K y Akt asociadas a los Trk. Con este mecanismo entrecruzado los ligandos de GPCR pueden usar las vías de señalización de los Trk en ausencia de neurotrofina y activar la vía Akt de supervivencia neuronal. De esta forma se explica algunas de las acciones neuroprotectoras y de promoción de la supervivencia neuronal de los GPCR y apoya el uso terapéutico de los agonistas GPCR en los trastornos neurodegenerativos (**Figura 7**) [59, 60].

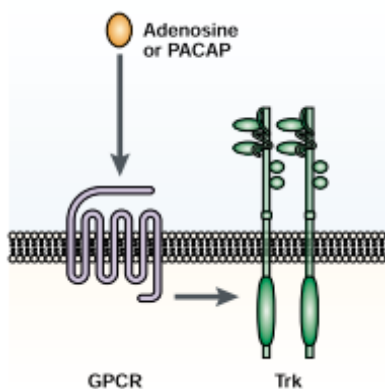


Figura 7. Transactivación de receptores tirosin quinasa Trk por receptores GPCR.

La transactivación de los receptores Trk por los ligandos de GPCR como adenosina y PACAP resultan en neuroprotección. Adaptado de Chao(2003) [59].

3. Neuropatías periféricas hereditarias

La función del SNP es conectar el SNC con el ambiente que rodea al organismo. Para este propósito la función normal del SNP es completamente dependiente de la correcta organización morfológica y molecular de los nervios periféricos. El origen de las diferentes fibras nerviosas de los nervios periféricos procede de motoneuronas de la porción ventral de la médula espinal, de neuronas sensitivas del ganglio dorsal y neuronas del SNP autónomo. A su vez, los nervios periféricos se componen de fibras nerviosas mielinizadas y no mielinizadas.

La neuropatía periférica es la afectación de algunos o todos los nervios periféricos en los que se afectan los axones, la vaina de mielina o ambas. Se manifiestan con una combinación de signos y síntomas sensitivos, motores y autonómicos. La alteración más frecuente y con mayor gravedad es la afectación distal de las fibras nerviosas de diámetro grande en los miembros inferiores y la neuropatía más común es la sensitiva motora simétrica distal. Según la función de las fibras que se alteran las neuropatías se clasifican en: sensitivas, motoras, autonómicas o mixtas. Y según el componente de la fibra nerviosa que se altere en: axonales o desmielinizantes. De acuerdo con la etiología, las neuropatías se agrupan en: i) hereditarias o neuropatías periféricas hereditarias (NPH); ii) adquiridas por agentes tóxicos, reacciones adversas de fármacos, enfermedades como diabetes mellitus, alcoholismo, infecciones como difteria o lepra, autoinmunes, inflamatorias y paraneoplásicas; iii) idiopáticas, en las que no se conoce la causa.

Las neuropatías periféricas hereditarias (NPH) son trastornos que afectan a los nervios periféricos y se clasifican en neuropatías sensitivo-motoras hereditarias (NSMH), neuropatías motoras hereditarias (NMH), neuropatías sensitivas hereditarias (NSH) y neuropatías sensitivas y autonómicas hereditarias (NSAH). (Grupo de estudio de enfermedades neuromusculares. Sociedad española de neurología, <http://www.sen.es.html>)

Con todo ello la FRDA se clasifica como una neuropatía periférica hereditaria (NPH) con herencia recesiva de tipo sensitivo con pérdida axonal que afecta a las fibras gruesas. O también puede clasificarse como una neuropatía hereditaria con semiología “plus”, que significa que va acompañada de síntomas y signos de otros sistemas además del SNP como miocardiopatía, de herencia horizontal y de tipo axonal. (Sociedad española de neurología, <http://www.sen.es.html>).

Las neuropatías periféricas son trastornos neurológicos comunes pero las terapias efectivas son limitadas. Muchas de las neuropatías periféricas se caracterizan por una pérdida axonal distal que resultan en una degeneración *dying-back*, como es el caso de la FRDA. Este proceso de degeneración es dependiente de la longitud axonal y resulta en una degeneración axonal distal más que en una pérdida de los somas neuronales. Las terapias para las neuropatías periféricas están diseñadas para el control de los síntomas del dolor, pero no para tratar la degeneración axonal que subyace. Muchas de las terapias neuroprotectoras que se han aplicado se desarrollaron inicialmente para los trastornos del SNC, como infarto cerebral o esclerosis múltiple, con el propósito de promover la supervivencia de las neuronas dañadas. Sin embargo estas terapias no han sido efectivas en las neuropatías periféricas debido a que el trastorno patológico primario que provoca los síntomas es la degeneración axonal distal y no la muerte neuronal. La muerte neuronal, si ocurre, es un evento muy tardío para ser tratable. Sin embargo, la degeneración axonal distal es un hecho temprano susceptible de tratamiento, por lo que el estudio de los mecanismos de la biología y la degeneración axonal emergen como un campo muy importante para diseñar nuevas dianas terapéuticas en las neuropatías periféricas [61].

4. Programas intrínsecos celulares de eliminación axonal y su implicación en la neurodegeneración

La eliminación selectiva de los axones, dendritas y conexiones sinápticas, sin muerte de la neurona, es común en muchos procesos biológicos y fisiológicos neuronales durante el desarrollo y la edad adulta. El mecanismo de eliminación axonal aporta a las neuronas dos características muy importantes: la conectividad exacta y precisa de las redes neuronales durante el desarrollo del sistema nervioso y la plasticidad neuronal durante la edad adulta necesaria para el crecimiento, el aprendizaje, la memoria y la respuesta a los daños neuronales, a las enfermedades neurodegenerativas y al propio proceso de envejecimiento, eliminando los circuitos neuronales afectados y promoviendo su reparación [54, 62, 63].

Por lo tanto los mecanismos intrínsecos de eliminación axonal que utiliza la neurona se dividen en mecanismos de eliminación axonal en un contexto fisiológico, como la eliminación axonal durante el desarrollo, y mecanismos de eliminación axonal en un contexto patológico, como la eliminación axonal tras un daño neuronal agudo o en el daño crónico producido por las enfermedades neurodegenerativas.

4.1. La eliminación axonal durante el desarrollo

La eliminación axonal durante el desarrollo (*pruning*) representa un importante mecanismo para maximizar la eficiencia de los circuitos neuronales maduros. Las neuronas inmaduras generan más conexiones axonales con las células diana postsinápticas de las que son necesarias, por lo que en la etapa final del desarrollo se refina la conectividad, eliminando las superfluas y manteniendo las conexiones apropiadas [63, 64]. La eliminación axonal durante el desarrollo se puede dar por varios mecanismos: degeneración axonal local, retracción axonal, efusión de axosomas, o una combinación de retracción y degeneración, en todos los casos sin muerte neuronal. Los tres tipos de eliminación axonal se diferencian por la morfología de la rotura del axón y por las vías moleculares que gobiernan su ejecución (**Figura 8A-C**) [62, 63].

4.1.1. Degeneración axonal

La degeneración axonal es un proceso activo de autodestrucción controlada de segmentos neuríticos enteros, que no implica la muerte neuronal, y que consta de tres pasos: 1) inducción en una determinada neurona, 2) degeneración de determinados fragmentos dentro de la neurona con desensamblaje de los microtúbulos, vesiculación axonal y formación de esferoides axonales que concluyen con la fragmentación axonal y 3) rápida fragmentación y eliminación de los fragmentos axonales degenerados por reclutamiento de los fagocitos locales (**Figura 8A**). El proceso de degeneración axonal es distinto según la especie, el estado de

maduración neuronal y las causas que lo originan, sin embargo comparten algunos puntos moleculares comunes, y siempre se ejecuta en compartimentos axonales altamente restringidos sin afectación del soma neuronal [54, 62, 63].

La hipótesis neurotrófica propone que durante el desarrollo, las neuronas deben competir por cantidades limitadas de factores neurotróficos derivados de los tejidos diana. Los tejidos diana modulan de esta forma la selección de la supervivencia celular para mantener sólo las conexiones apropiadas. Esta hipótesis implica que la eficacia de la supervivencia neuronal depende de la cantidad de factores neurotróficos producidos y que la expresión de los receptores específicos en las distintas poblaciones neuronales es la que confiere la capacidad de la respuesta neuronal. Por lo tanto, la pérdida de las señales tróficas desde las dianas adecuadas causa que las ramas inapropiadas degeneren, de forma similar a lo que ocurre cuando a una neurona se le priva localmente de NGF, en un proceso de degeneración axonal local programada. La depleción local de neurotrofina en el axón, pero no en el soma, causa una rápida degeneración axonal local en la zona deplecionada de NGF, en ausencia de un daño axonal inicial, y sin muerte neuronal. El axón se vesícula y se hincha localmente, los neurofilamentos se fragmentan y muchos de los componentes del axoplasma, como mitocondria y vesículas son destruidos, entonces el tallo del axón degenera de una manera sincrónica. Una vez iniciado el proceso se completa en unas cuantas horas y la glía de los alrededores fagocita y digiere los remanentes de estos axones eliminados [54, 63, 64]. El déficit de factores tróficos localmente en el axón pone en marcha un efector no clásico de la apoptosis como es la caspasa-6, que dirige la degeneración axonal local y el soma se protege sobreexpresando XIAP para inhibir las caspasas iniciadoras y efectoras en el soma. Cuando el déficit de NGF también es en el soma neuronal se activa la caspasa-3 que dirigirá a la neurona a la muerte [63, 65]. La supresión local de caspasas puede ser una aproximación importante para la protección de brazos axonales específicos *in vivo* [63]. Factores extrínsecos, como Bcl-w, pueden modular indirectamente la señalización de caspasas en el axón. Bcl-w interactúa con Bax y suprime la actividad caspasa-6, el transporte del mRNA de Bcl-w a los axones permite su síntesis local y permite la supervivencia de los axones por supresión de la señalización de caspasas [63].

4.1.2. Retracción axonal

La retracción axonal es un proceso de acortamiento local del axón durante el crecimiento axonal en el que el axón es gradualmente retirado hacia atrás y el material axonal es transportado retrógradamente hacia las secciones proximales del axón, conservando todo el material intracelular axonal (**Figura 8B**). Morfológicamente el axón permanece intacto y no presenta signos de fragmentación. En la retracción los microtúbulos conservan su función de carriles de transporte, y los filamentos de actina dirigen la retracción. La retracción es un proceso implicado en la guía y el crecimiento axonal y en la remodelación estructural de las neuronas en respuesta a experiencia, aprendizaje o daño [54, 62, 63].

4.1.3. Efusión de axosomas

La efusión de axosomas es un mecanismo de eliminación axonal ejecutado por las células de Schwann y descrito en la eliminación sináptica en la unión neuromuscular (**Figura 8C**). Los axones de las motoneuronas que han intentado conectar con el músculo pero no han sido elegidas retroceden mediante retracción y efusión de pequeñas vesículas llamadas axosomas. Estos axosomas contienen orgánulos intactos y elementos de citoesqueleto, que son internalizados y degradados por mecanismos asociados a lisosomas en las células de Schwann adyacentes. Es una retracción pero dirigida por mecanismos extrínsecos como las células de Schwann [63].

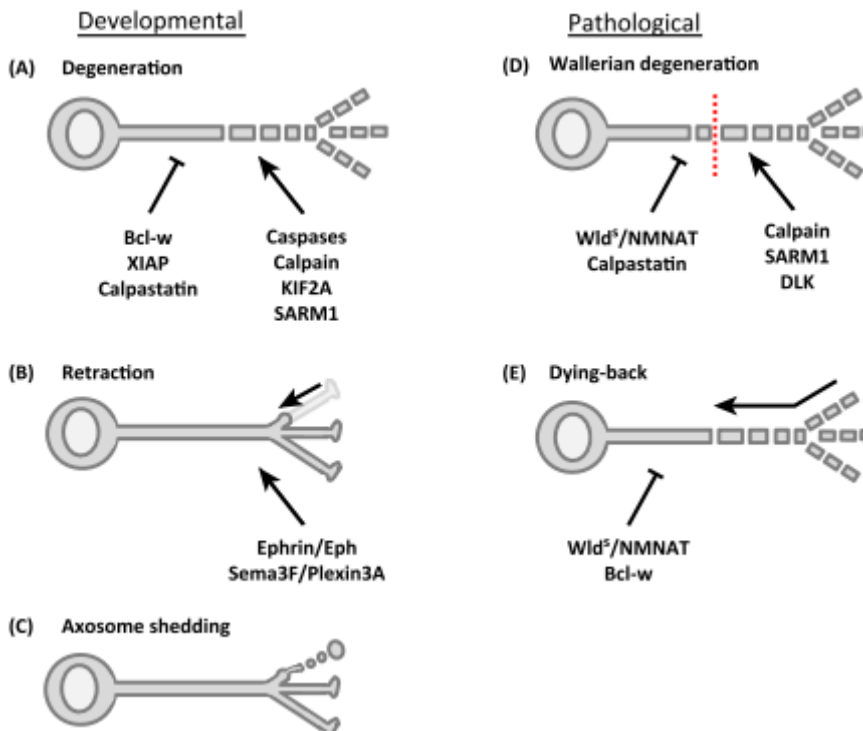


Figura 8. Mecanismos de eliminación axonal.

Esquemas de la eliminación axonal durante el desarrollo (A-C) y pérdida axonal patológica (D-E) en las neuronas. **A)** La degeneración axonal durante el desarrollo, como ocurre con la deprivación trófica, resulta en la degradación del citoesqueleto y la fragmentación axonal. Bcl-w, XIAP y/o calpastatina previenen la degeneración y caspases, calpaína, KIF2A y SARM1 dirigen la degeneración. **B)** La retracción implica el retroceso y la absorción de pequeños segmentos axonales como son las ramas terminales axonales. Está dirigida por las vías Ephrin/Eph o Sema3F/plexin3A. **C)** Efusión de axosomas también elimina segmentos axonales pequeños con hinchazón del axón y la emisión de de remanentes axonales con membrana llamados axosomas. El mecanismo molecular todavía no se conoce. **D)** La degeneración Walleriana es un tipo de eliminación axonal patológica inducida por un daño axonal severo. Después de una fase de latencia, la zona distal al sitio del daño degenera en un proceso que implica el hinchamiento, la rotura del citoesqueleto y la fragmentación. Varias isoformas de NMNAT, la proteína de fusión Wlds y la calpastatina previenen la degeneración, mientras que SARM1, DLK y calpaína dirigen la degeneración.

E) En muchas enfermedades neurodegenerativas, los axones son eliminados mediante un proceso *dying-back* que implica el hinchamiento y la fragmentación axonal comenzando distalmente y propagándose en dirección proximal. Varias isoformas de NMNAT, la proteína de fusión Wlds y Bcl-w pueden oponerse a este proceso. Abreviaturas: Bcl-w, *B Cell Lymphoma w*; DLK, *dual leucine zipper kinase*; KIF2A, *kinesin superfamily protein 2A*; NMNAT, *nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase*; Sema3F, *semaphorin 3F*; SARM1, *Sterile Alpha And TIR Motif Containing 1*; Wld^s, *Wallerian degeneration slow protein*; XIAP, *X-linked inhibitor of apoptosis protein*. Adaptado de Pease y Segal (2014) [66].

4.2. La eliminación axonal patológica

Las neuronas tienen al menos dos programas de autodestrucción en respuesta a los daños. Uno es la muerte celular programada o apoptosis que se pone en marcha cuando las células están dañadas, infectadas o ya no se necesitan, y el otro es el programa de autodestrucción local del axón, más sutil y molecularmente distinto a la apoptosis, que se activa cuando el axón sufre un proceso traumático o degenerativo y que sirve para eliminar rápida y selectivamente la porción dañada del resto de la neurona [62]. Ambos procesos tienen estrechos mecanismos de control, que culminan con la desinhibición de la maquinaria de destrucción intrínseca ubicua y el reclutamiento eficiente de los fagocitos locales para la eliminación de los restos axonales [54, 67].

La degeneración axonal es un paso importante en la patogénesis de enfermedades neurológicas traumáticas o degenerativas, producidas por toxinas o por defectos genéticos. También es un evento secundario común en inflamación, trastornos metabólicos, trastornos de mielina e isquemia [68]. La pérdida axonal es un hecho patológico temprano en muchas de las enfermedades neurodegenerativas, como Parkinson, Alzheimer, Huntington y FRDA, siendo el conductor primario de la discapacidad funcional de los pacientes, responsable de la progresión clínica y de la muerte neuronal [63, 64, 67, 68].

Se han descrito diferentes formas de degeneración axonal, considerando la localización en el axón y las cinéticas de tiempo, con importantes diferencias en el mecanismo pero que convergen en algunos puntos moleculares comunes. El conocimiento riguroso de estas vías y mecanismos moleculares que las dirigen permitirán definir nuevas dianas para el desarrollo de una terapéutica neuroprotectora, e incluso regenerativa, frente al daño neuronal agudo y las enfermedades neurodegenerativas [62, 67].

4.2.1. Degeneración axonal aguda

La degeneración axonal aguda o autodestrucción local del axón es una desintegración axonal rápida al cabo de unas pocas horas de una lesión traumática en el SNC. Es un proceso confinado a 300-400 μm de la zona distal y proximal del axón y ha sido descrito en médula espinal y nervio óptico. En el momento de la lesión traumática se inicia un flujo de Ca^{2+} rápido hacia el axón, aumentando la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ axoplásmica y activando a la calpaína, una proteasa dependiente de Ca^{2+} , que ejecuta la fragmentación del axón. Los primeros cambios a nivel ultraestructural se vuelven

visibles durante los 30 minutos siguientes a la lesión y consisten en la condensación y pérdida de alineamiento de los neurofilamentos, seguido de la fragmentación de los microtúbulos, relacionado con la activación de la calpaína y la vía ERK/MAPK que ha sido sugerida como mediadora molecular. La rápida rotura del citoesqueleto permite el impedimento temprano del transporte axonal. Los signos indirectos en favor de esta suposición son la acumulación de orgánulos, en su mayor parte de mitocondria y vacuolas, formando hinchazones axonales locales que pueden encontrarse tempranamente. Otra característica ultraestructural de la degeneración axonal aguda es la activación local de la autofagia. La intervención farmacológica como la inhibición de los canales de Ca^{2+} en el momento de la lesión y la aplicación local de inhibidores de la calpaína y de la autofagia son altamente efectivas en la prevención de la degeneración axonal aguda, pero los efectos a largo término de estos tratamientos permanecen sin esclarecer [67].

4.2.2. Degeneración Walleriana

La degeneración Walleriana o degeneración axonal inducida por daño o lesión fue descrita por Waller en 1850 en el nervio periférico. Se refiere a una serie de eventos que ocurren en los axones distales cuando son separados del soma neuronal por lesión o transección axonal (**Figura 8D**). Durante 24-72 horas tras la transección, el axón permanece morfológicamente estable y el único evento visible es la acumulación de materiales en la terminación proximal del sitio de la lesión, debido a la interrupción del transporte axonal. Tras esta fase de latencia se dispara una secuencia de procesos estereotipados que llevan a la degeneración y eliminación de la porción distal del axón. El axón sufre una rotura rápida y progresiva, en sentido anterógrado, de su citoesqueleto en un todo o nada similar a la degeneración axonal aguda, y el reclutamiento de microglia y macrófagos permite fagocitar los restos axonales degenerados y la mielina para su completa eliminación, facilitando la regeneración y reparación [62, 67, 68]. La transección o disrupción física del axón permite la entrada del Ca^{2+} extracelular y la acumulación del Ca^{2+} intraaxonal, este hecho es necesario y suficiente para inducir la degeneración Walleriana por activación de la calpaína que ejecutan la proteólisis de los neurofilamentos y la rotura severa del citoesqueleto de los axones [54, 62, 63, 68]. El inicio de la degeneración supone previamente la sucesión de una serie de eventos. La calpastatina, un inhibidor de las calpaínas, tiene que ser degradado. Cambios en la mitocondria, incluyendo producción de ROS y la formación del poro de transición de permeabilidad mitocondrial, preceden y dirigen la degeneración axonal [63]. La activación del sistema ubiquitina-proteosoma (UPS, *ubiquitin-proteasome*) también es un hecho temprano que se requiere para iniciar la degeneración axonal [54].

El descubrimiento de una mutación espontánea en la cepa de ratón C57BL/Wld^S, que expresa la proteína de fusión Wld^S, reveló que esta proteína de localización nuclear enlentecía unas diez veces el proceso de degeneración Walleriana en el SNP y SNC, lo que permitió estudiar el mecanismo que subyace en la degeneración axonal

Walleriana [67-69]. La proteína mutante Wld^S es un producto génico quimérico que contiene el fragmento N70 de la proteína UFD2a/UBE4B y la proteína NMNAT1, unidas por un dominio de 18 aa, de función desconocida [67-69]. El fragmento N70 no presenta la actividad catalítica de la ligasa ubiquitina UBE4B pero sí conserva un pequeño dominio de 16 aa en el N-terminal que permite la unión a la proteína citoplasmática VCP (*Valosin-containing protein*). Esta secuencia de 16 aa es muy importante para la localización citoplasmática y axoplásmica de Wld^S, si se pierde este dominio la proteína Wld^S presenta una localización exclusivamente nuclear y se pierde la protección axonal. La NMNAT1 es una proteína nuclear que cataliza el último paso de la síntesis del cofactor NAD⁺ en mamíferos. La actividad protectora de Wld^S radica en la capacidad de síntesis de NAD⁺ por la NMNAT1, y depende del fragmento N70 que localiza a la proteína Wld^S en el axón donde ejerce su actividad protectora frente a la degeneración. Por lo que, tanto el fragmento N70 de la UBE4B como la proteína NMNAT1 se requieren para la acción neuroprotectora de Wld^S [63, 67, 69]. La proteína Wld^S bloquea los cambios de la señalización del Ca²⁺ y la producción de ROS y del PPTM, implicando la actuación de la Wld^S en un nivel muy temprano desde el momento de la lesión [63].

A nivel molecular no hay interacción entre la degeneración Walleriana y la apoptosis. Ni la sobreexpresión de Bcl-2, ni la inhibición de BAX o BAK, previenen la degeneración axonal en daño o enfermedad. La activación de caspasa-3 o sus productos no es detectable en los axones y la inhibición de la caspasa no bloquea la degeneración Walleriana, por lo que la apoptosis no parece estar relacionada con la degeneración Walleriana [68]. Esto se ve confirmado por el hecho de que la proteína Wld^S no bloquea la eliminación axonal en el desarrollo y no evita la muerte neuronal, ambos procesos relacionados con caspasas [63].

La degeneración Walleriana puede ocurrir en SNP y SNC [64]. Los rasgos de la degeneración Walleriana incluyen desintegración granular del citoesqueleto, presencia de ovoides de mielina degenerando, fragmentación de los axones distales y en el SNC grandes esferoides axonales [69].

4.2.3. Degeneración *dying-back*

La degeneración *dying-back* o degeneración axonal crónica es un proceso de degeneración axonal descrito por Cavanagh en 1964. Se refiere a una serie de eventos que se caracterizan por la degeneración inicial de las sinapsis y los axones distales que progresa hacia la zona proximal del soma neuronal en un proceso denominado degeneración *dying-back* o muerte hacia atrás. El axón degenera lenta y centrípetamente desde la terminación distal, en ausencia de daño físico o químico (**Figura 8E**). La naturaleza y el sitio inicial del daño son desconocidos y no está claro si el proceso comienza en el axón en sí mismo o en el soma neuronal [61]. La degeneración axonal puede preceder a la pérdida de los somas neuronales durante meses [62, 70]. Las causas que lo originan son variadas e implican una fase inicial de disfunción de la conexión sináptica, y/o degeneración de las zonas distales del axón,

seguida de una fase de degeneración del axón entero, en sentido retrógrado, y una fase final de fragmentación axonal de forma similar a la degeneración Walleriana, incluyendo la formación de esferoides axonales, el desensamblaje de los microtúbulos y la fragmentación del citoesqueleto [62, 67, 70]. Los mecanismos bioquímicos que subyacen en esta forma de degeneración no se conocen del todo pero se han implicado procesos como la patología sináptica, la disfunción mitocondrial, el control pobre de la calidad de la mitocondria, y la disrupción del transporte axonal como factores causantes de *dying-back* en algunas neuropatías periféricas [67, 69].

El *dying-back* es la forma más común de degeneración axonal descrita en el SNP. Se encuentra en neuropatías periféricas causadas por daños tóxicos, metabólicos e infecciosos, como envenenamiento por acrilamida, neuropatía diabética, alcoholismo, y SIDA. También en enfermedades neurodegenerativas del SNP como FRDA y del SNC como esclerosis lateral amiotrófica (ELA), atrofia muscular espinal, trastorno espinocerebeloso, Alzheimer, Parkinson, Huntington y enfermedades por priones [54, 62, 64, 67, 70]. Es remarcable cómo una diversidad de daños neuronales tan amplia provoca una neuropatía sensitiva *dying-back* idéntica, sugiriendo que en función de la naturaleza, la extensión o el tiempo del daño, el axón responde de una forma estereotipada activando el programa de autodestrucción axonal en *dying-back*, para desconectarse de sus dianas postsinápticas y conservar sus recursos [61, 64]. Bajo condiciones neurodegenerativas moderadas hay dos factores que favorecen la degeneración distal por *dying-back*. Estos factores son la distancia axonal de las largas neuronas periféricas y neuronas del SNC, como ocurre en Alzheimer, Parkinson y enfermedades de la motoneurona, y la edad o envejecimiento que causa la atrofia de muchos árboles axonales y exacerba los efectos de los trastornos neurodegenerativos [69].

En contraste a la degeneración Walleriana, en la que la localización y el tiempo de la lesión inicial son conocidas y provocan la rápida degeneración de todos los axones de un nervio, la degeneración axonal en las enfermedades neurológicas crónicas representa un gran reto ya que no se conoce la localización ni el tiempo de inicio del daño, no ocurre simultáneamente en todos los axones de un cierto tracto y a menudo el proceso se extiende en grandes períodos de tiempo antes de la aparición de la sintomatología [67, 69]. Además hay que destacar que en el *dying-back* el segmento distal del axón está sufriendo una degeneración sin compartimentalización física ya que, el proceso de eliminación axonal ocurre al mismo tiempo y en la misma neurona que intenta permanecer funcional. Por el contrario, en la degeneración Walleriana la propia lesión axonal compartimentaliza y aísla físicamente el fragmento axonal que va a ser destruido [64]. Otro hecho importante en las enfermedades neurodegenerativas es la diferencia en la sensibilidad a las señales activantes de la degeneración en distintas ramas axonales de un mismo soma neuronal [63]. Ésta diferencia en la sensibilidad se ha encontrado en ELA y en Alzheimer en las que aparece una población de axones resistentes que no presenta degeneración en respuesta al mismo estrés. Entender el mecanismo de la degeneración axonal en cada una de las distintas enfermedades neurodegenerativas está limitado por las causas multifactoriales, por la

diferencia en la velocidad de la neurodegeneración, por la diferencia de los sitios clave donde ocurren los eventos patológicos y por la diferencia de las respuestas de los axones vulnerables o resistentes [69].

4.2.4. Degeneración *Wallerian-like*

La degeneración Walleriana y el *dying-back* difieren en muchos aspectos como las causas, la direccionalidad, la velocidad, la compartimentalización y la sensibilidad individual de las neuronas a las señales activantes. Sin embargo comparten la fase final de fragmentación axonal, incluyendo la formación de esferoides axonales, el desensamblaje de los microtúbulos y la fragmentación del citoesqueleto. Estas diferencias han sido interpretadas como evidencias de mecanismos múltiples, sin embargo la información emergente converge en vías comunes y demanda el replanteamiento de los mecanismos de degeneración axonal y su clasificación [68].

La sobreexpresión de Wld^S, que retrasa la degeneración Walleriana, también evita la pérdida de axones en algunas neuropatías periféricas, Parkinson y enfermedades de la motoneurona, sugiriendo que hay un punto común en el mecanismo de degeneración *dying-back* y degeneración Walleriana [68]. Cuando la degeneración *dying-back* se suprime con la expresión de Wld^S se caracteriza como degeneración *Wallerian-like* [63, 69, 71]. Una detallada investigación de las enfermedades *dying-back* con respecto a los patrones de degeneración axonal y a la sensibilidad a la proteína Wld^S podrían proveer de importantes ideas en el mecanismo que permite la pérdida de los axones en cada una de estas enfermedades [54].

4.2.5. Modelo de lesión focal

El modelo de lesión focal replantea y enlaza los dos mecanismos de degeneración, la walleriana y el *dying-back*. Este modelo propone que una o más lesiones focales pueden disparar la degeneración Walleriana en los axones distales mientras que el axón proximal permanece intacto. La lesión no debe ser necesariamente la transección del axón, ya que un bloqueo del transporte axonal también puede disparar la degeneración Walleriana. De esta forma se explicaría porque en el *dying-back* la porción proximal está intacta mientras que la degeneración axonal se muestra en las terminaciones distales, sin necesidad de inferir que exista una propagación retrógrada de la degeneración por un daño distal primario [68].

El modelo de degeneración axonal focal o FAD (*focal axonal damage*) ha sido descrito en lesiones de esclerosis múltiple, y comienza con el hinchamiento focal del axón progresando hasta la fragmentación axonal. Morfológicamente se observa al principio el hinchamiento focal de los axones con acumulación de orgánulos y mitocondria dismórfica y una morfología anómala de los nodos de Ranvier. Esta hinchazón focal se acompaña de disfunción del transporte axonal y permite la disrupción del axón seguida de una fragmentación multifocal *like-Walleriana* del axón. En este modelo se ha visto que la patología mitocondrial focal intraaxonal es un signo ultraestructural de

daño temprano y precede a los cambios morfológicos del axón. Los niveles aumentados de ROS producidos por los macrófagos en las lesiones inflamatorias pueden difundir a través de la mielina, inhibir la CTE y favorecer el fallo energético mitocondrial, actuando como un factor iniciador de FAD. La exposición continuada a las ROS y el fallo energético favorecen la dishomeostasis iónica que acumula Na^+ y Ca^{2+} intraaxonal, activando calpaína que causan la rotura focal del citoesqueleto axonal. La neutralización de ROS y de especies reactivas del nitrógeno (RNS, *Reactive Nitrogen Species*) rescata los axones que tienen iniciado el proceso degenerativo [67, 72, 73].

5. La mitocondria y su implicación en patología

La mitocondria es un orgánulo de doble membrana, dinámico y filamentoso, que lleva a cabo funciones esenciales para la supervivencia celular. Una de las principales funciones es la producción de energía necesaria para las actividades biológicas y el crecimiento celular. Pero además es un punto clave en la regulación del metabolismo del Ca^{2+} intracelular, de la producción de estrés oxidativo y de la muerte celular por apoptosis y necrosis. La mitocondria también está implicada en la biosíntesis de grupos hemo y de hormonas tiroideas, en el metabolismo de nutrientes y en la eliminación del amonio. Por todo ello la mitocondria es un lugar de integración tanto de vías metabólicas como de las vías de señalización de la muerte celular. La mitocondria responde al estrés metabólico y genético iniciando las señales para modular la expresión de genes nucleares y dirigir cambios en la función celular [74, 75].

Debido a su papel esencial en la energética, el metabolismo y la regulación de la muerte celular, principalmente por la producción de estrés oxidativo, la mitocondria tiene un papel central en la etiología del envejecimiento y en la patogénesis de muchas enfermedades crónicas, especialmente en las enfermedades neurodegenerativas.

La mitocondria se distribuye preferentemente en las áreas neuronales con alta demanda metabólica como los conos de crecimiento, los nodos de Ranvier y las zonas sinápticas. En estas áreas la mitocondria aporta el ATP necesario para el crecimiento axonal, la transmisión del potencial de membrana y la liberación y recaptación de neurotransmisores. El aporte energético de la mitocondria también es fundamental en el transporte axonal de vesículas, proteínas y otros orgánulos neuronales. Incluso el transporte bidireccional de la mitocondria es interrumpido en puntos concretos del axón, por extensas pausas de tiempo (*dockings*) en los que se piensa que hay gran demanda energética [76].

En una típica motoneurona espinal o neurona sensitiva del ganglio dorsal muchos de los retos de los axones están relacionados con su longitud extrema. Un metro de axón motor o sensitivo es unas 10.000 veces las dimensiones de su soma neuronal y sobre 10 veces su volumen, por lo que el transporte del material desde el soma, en sentido

anterógrado, y hasta el soma, en sentido retrógrado, exige de largas distancias. El aporte energético mitocondrial para cubrir la gran demanda metabólica tanto en el soma neuronal, para la síntesis de las macromoléculas que hay que transportar, como en el axón, para potenciar este proceso de transporte, son puntos clave en la salud axonal [71].

5.1. Bioenergética mitocondrial y regulación del estado REDOX de la célula

En las células aeróbicas, la mitocondria interviene en la última fase del catabolismo celular de aminoácidos, glúcidos y ácidos grasos, que a través de la desaminación oxidativa, la glucólisis y la β -oxidación, respectivamente, convergen en la producción de acetil coenzima A (acetil-CoA). El acetil-CoA, en la matriz mitocondrial, es transformado mediante el ciclo de krebs o ciclo del ácido tricarboxílico (ATC) en compuestos precursores de otras biomoléculas. Los átomos de hidrógenos se incorporan a las coenzimas oxidadas NAD^+ y FAD^+ , reduciéndolos a NADH y FADH_2 , y los átomos de carbono se liberan en forma de CO_2 . El poder reductor de NADH y FADH_2 , libera los electrones en una serie de cuatro transportadores reagrupados bajo el nombre de cadena respiratoria o cadena de transporte de electrones (CTE), embebida en la membrana mitocondrial interna (MMI), y en último término son transferidos al oxígeno molecular para formar agua. El acoplamiento de la transferencia de electrones entre los donadores y aceptores de electrones a través de la CTE genera un gradiente electroquímico (Δp) a través de la MMI que dirige la síntesis de ATP, por la ATP sintasa, en un proceso global de producción de energía llamado fosforilación oxidativa u OXPHOS. Los procesos en la MMI están representados en la **Figura 9** [31, 74, 75, 77, 78].

La CTE clásica fue descrita por Green and Tzagoloff (1966) como una secuencia funcional de cuatro complejos enzimáticos dispuestos aleatoriamente en la MMI impermeable, que se conectan por dos moléculas redox móviles, el coenzima Q o ubiquinona (CoQ) y el citocromo *c* (Cit *c*). Los cuatro complejos, C_I , C_{II} , C_{III} y C_{IV} se componen de numerosas subunidades proteicas, unas codificadas por genes nucleares y otras por el DNA mitocondrial (mtDNA), con la excepción del C_{II} que es totalmente nuclear. También se componen de grupos prostéticos como FAD y FMN de las flavoproteínas, de grupos hemo de los citocromos y de centros Fe-S y centros Cu.

La entrada principal de electrones se realiza en los C_I y C_{II} . Los grupos protéticos son los encargados de realizar la transferencia de los electrones a lo largo de la CTE. Por esta razón los centros Fe-S son esenciales para la actividad de los C_I , C_{II} y C_{III} de la CTE. Su biosíntesis e incorporación a las proteínas es un proceso complejo que requiere de numerosos factores incluyendo proteínas ensambladoras, como ISCU y NFU1, cistein desulfurasas, como ISCS, y donadores de hierro y chaperonas como la frataxina [31]. Los grupos hemo, presentes en los citocromos *a*, *b* y *c*, son esenciales para la actividad de los C_{III} y C_{IV} de la CTE. Los centros de Cu son esenciales para la actividad del C_{IV} , ya que aceptan los electrones del Cit *c* y forman parte del centro activo donde el O_2 se reduce a H_2O .

La MMI contiene cantidades pequeñas de otras flavoproteínas con actividad transferidora de electrones (ETF, *electron transfer flavoprotein*). Las ETF transfieren los electrones directamente al CoQ y de forma independiente a los C_I y C_{II} . Las más importantes son la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial (G3PDHm) que forma parte de una importante lanzadera para la oxidación del NADH citosólico que proviene del ciclo de Krebs y la ETF y la ETF ubiquinona reductasa (ETF:QOR), que recogen los electrones de los ácidos grasos rotos en la β -oxidación en la matriz mitocondrial a través de la acil-CoA deshidrogenasa (acil-CoA DH) [78-80].

Los complejos se asocian en supercomplejos o respirasomas que supone una ventaja cinética, además de tener un papel en la estabilidad y el ensamblaje de los complejos individuales y en la prevención de la formación ROS [77, 79, 80].

En los C_I , C_{II} y C_{IV} de la CTE la diferencia del potencial redox que se genera por el transporte de electrones permite la traslocación de protones (H^+) hacia el espacio intermembrana, con la excepción del C_{II} que no genera traslocación de H^+ . Según la teoría quimiostática, propuesta por Mitchel en los 60, el gradiente de concentración de protones sirve como almacén de energía que dirige la formación de ATP, es la fuerza protonmotriz (Δp) o potencial quimiosmótico. La fuerza protonmotriz (Δp) es el resultado de la contribución de la diferencia de concentración de protones (ΔpH , potencial químico) y de la diferencia de carga eléctrica ($\Delta\psi_m$ o potencial eléctrico) generados a través de la MMI impermeable. La mayor contribución a la fuerza protonmotriz (Δp) la realiza el $\Delta\psi_m$ y por ello se utiliza el término $\Delta\psi_m$ o potencial de membrana mitocondrial (PMM) para referirse a la fuerza protonmotriz (Δp).

El $\Delta\psi_m$ es el punto central que regula la entrada de electrones a la CTE y la producción de ATP. A mayor $\Delta\psi_m$ menor proporción de transporte de electrones. Para una correcta producción de ATP los valores de $\Delta\psi_m$ deben estar comprendidos entre -100 mV y -150 mV. Bajo condiciones fisiológicas, sólo la privación de sustrato NADH o $FADH_2$, puede limitar y disminuir la generación del $\Delta\psi$, disminuyendo la generación de ATP [77, 81].

La ATP sintasa o C_V consume el gradiente de H^+ o $\Delta\psi_m$ para sintetizar ATP y devuelve los H^+ a la matriz mitocondrial. Está compuesta de tres fragmentos: F_0 , localizado en la MMI que actúa como canal de los H^+ ; F_1 , que protruye hacia la matriz mitocondrial y sintetiza ATP en las subunidades α y β una vez han pasado los H^+ ; y la proteína b_2 que conecta los fragmentos F_0 y F_1 y que le confiere sensibilidad a la oligomicina (OCSF, *Oligomycin sensitivity-conferring protein*).

Aquellas situaciones que disminuyen la generación del $\Delta\psi_m$, provocan la disminución de la producción de ATP por la ATP sintasa. Las situaciones que disminuyen la generación del $\Delta\psi_m$ son variadas, como p. ej.: el déficit de actividad de los complejos de la CTE, el daño de la MMI que hace que aumente su permeabilidad y se produzca la fuga de H^+ a su través o el uso de desacopladores (p. ej.: CCCP) que transportan los H^+ unidos y atraviesan la MMI. Estas situaciones que disminuyen la generación del $\Delta\psi_m$ provocan que la ATP sintasa actúe de forma reversa como una hidrolasa de ATP o ATPasa, hidrolizando el ATP citoplasmático y liberando la energía en forma de calor [74, 81].

El $\Delta\psi_m$ influye a su vez sobre procesos mitocondriales como son la permeabilidad de la MMI, la distribución del Ca^{2+} celular y la producción de ROS. $\Delta\psi_m$ altos (hiperpolarización mitocondrial) favorecen el aumento exponencial de la formación de ROS y de la permeabilidad de la MMI a los H^+ (desacoplamiento de la OXPHOS). $\Delta\psi_m$ bajos (despolarización mitocondrial) disminuyen la capacidad recaptadora de Ca^{2+} de la mitocondria, debido a la pérdida de la carga negativa en el interior de la matriz mitocondrial, que ejerce de gran fuerza termodinámica en favor de la acumulación de cationes [82]. Por lo tanto, el $\Delta\psi_m$ es el punto central que controla la capacidad de la mitocondria para generar ATP, generar ROS, generar calor, importar el Ca^{2+} citosólico e importar proteínas [31, 81]. La formación de ATP, la formación de ROS y la capacidad tamponadora de Ca^{2+} de la mitocondria están estrechamente interrelacionadas por su común dependencia con el $\Delta\psi_m$. Pero a la vez, esta dependencia es reciproca, ya que todos ellos son capaces de influir directamente en el correcto mantenimiento del $\Delta\psi_m$ [81].

Durante el transporte de los electrones a lo largo de la CTE se originan intermediarios reducidos del oxígeno como el anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), el anión peróxido (O_2^{2-}) y el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), también llamados ROS, que se mantienen fuertemente unidos hasta su completa conversión en agua en el C_{IV} . Hay al menos ocho sitios capaces de producir cantidades considerables de ROS en la mitocondria (**Figura 9**) [83].

Un reducido porcentaje de estas ROS escapa de la CTE y son neutralizadas por un eficiente sistema de defensa antioxidante compuesto por: 1) superóxido dismutasas (SODs), como la MnSOD mitocondrial y la Cu-ZnSOD citosólica; 2) catalasas (CATs); 3) glutatión peroxidasas (GPXs); 4) glutatión o GSH mitocondrial; 5) peroxirredoxinas (Prxs); 6) tiorredoxinas (Trxs); 7) citocromo c oxidado; 8) Vitamina E (alfa-tocoferol) y 9) vitamina C (ascorbato) [31, 74, 77, 83]. Las reacciones enzimáticas de detoxificación de estos sistemas están representadas en la **Figura 9**.

Un exceso de producción de ROS, que supere la actividad de los sistemas de detoxificación, puede generar un daño oxidativo e incluso puede generar nuevas especies con mayor poder oxidativo. Es el caso del H_2O_2 , un oxidante moderado que puede causar daños oxidativos por sí solo o puede convertirse, en presencia de Fe^{2+} y Cu^+ mediante la reacción de Fenton, en el altamente reactivo radical hidroxilo $\text{OH}\cdot$. O el caso del $\text{O}_2^{\bullet-}$, que puede reaccionar con el óxido nítrico (NO) y generar el peroxinitrito (ONOO^-), un potente oxidante [74].

Un aumento de la tasa de respiración mitocondrial, un aumento del $\Delta\psi_m$ y defectos en la CTE aumentan la liberación de ROS [74, 77, 81]. A nivel celular, el efecto dañino de la sobreproducción de ROS ocurre a través de la degradación oxidativa de proteínas, lípidos y DNA, resultando en una condición conocida como estrés oxidativo. La producción de ROS disocia los supercomplejos, promoviendo la disfunción mitocondrial, y causa daños en el mtDNA, pudiendo alterar las subunidades de los complejos codificadas mitocondrialmente, promoviendo la disfunción mitocondrial. Todo ello lleva a la formación de más ROS, más estrés oxidativo y mayor fallo energético, en un círculo vicioso de daño oxidativo. Unos niveles excesivos de ROS provocan una disminución del Ca^{2+} mitocondrial y pueden disparar la muerte celular

programada o apoptosis por apertura del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (PPTM) que libera factores proapoptóticos [77, 82].

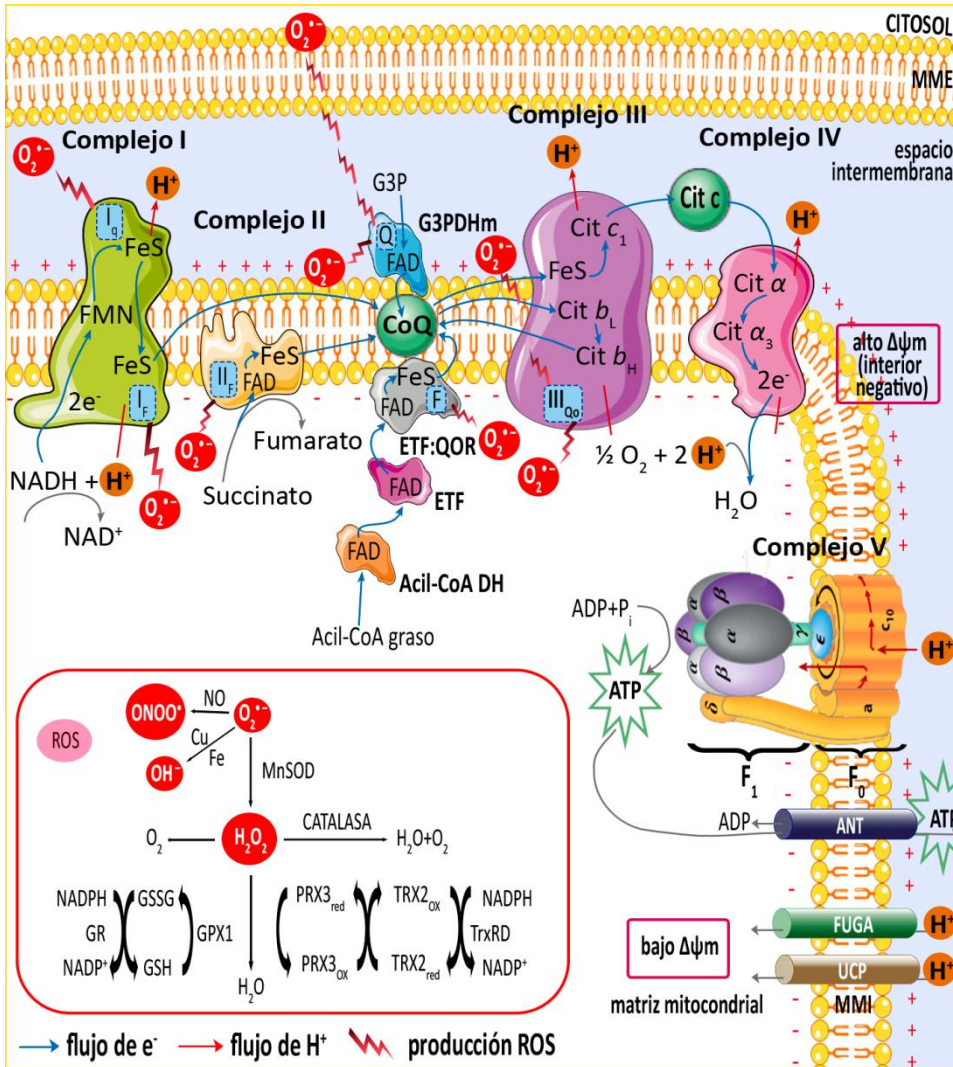


Figura 9. Representación del sistema global OXPHOS y otras flavoproteínas transferidoras de electrones.

Se representan dispuestos en la MMI los complejos de la CTE, Complejo I (C_I) o NADH-CoQ reductasa, el Complejo II (C_{II}) o succinato-CoQ reductasa; Complejo III (C_{III}) o ubiquinol-citocromo c reductasa y Complejo IV (C_{IV}) o citocromo c oxidasa. CoQ y Cit c son las moléculas móviles que conectan los complejos. Se representan las entradas alternativas de electrones a través de la G3PDHm y de la ETF y la ETF:QOR. La línea continua azul representa el flujo de electrones a través de los grupos prostéticos de la CTE. La línea sólida roja presenta la traslocación H^+ al espacio intermembrana que genera el $\Delta\psi_m$ o potencial de membrana mitocondrial (PMM), haciendo el interior de la matriz mitocondrial negativo. Se representa el Complejo V (C_V) o ATPsintasa, la síntesis de ATP y su transporte a través de ANT o

intercambiador de nucleótidos adenina ATP/ADP. La FUGA de H^+ y las UCP o proteínas desacopladoras representan dos situaciones que consumen el gradiente de H^+ de forma secundaria al C_V disminuyendo el $\Delta\psi_m$ y la síntesis de ATP. El relámpago rojo representa los sitios de la CTE en los que se produce el $O_2^{\bullet-}$ o anión superóxido. En el recuadro rojo se representan los sistemas antioxidantes que detoxifican el $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 o peróxido de hidrógeno y agua. Las enzimas detoxificantes son MnSOD o manganeso superóxido dismutasa, catalasa, sistema GPX/GSH o glutarredoxina/glutati6n y el sistema PRX/TRX o peroxirredoxina/tiorredoxina. Los círculos rojos representan las ROS que pueden formarse: $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , $ONOO^-$ o peroxinitrito y OH^\bullet o radical hidroxilo [79, 83].

5.2. Regulaci6n de OXPHOS y producci6n de ATP

La producci6n de ATP se regula fisiol6gicamente por la demanda energ6tica celular y por los niveles de Ca^{2+} mitocondriales. Ambos mecanismos necesitan un adecuado $\Delta\psi_m$, siendo el C_I el responsable de los cambios adaptativos y fisiol6gicos en la eficiencia de la OXPHOS.

El factor que determina la velocidad de la OXPHOS o tasa de respiraci6n (cantidad de Pi incorporado en el ATP/cantidad de O_2 consumido) es el estado energ6tico de la c6lula, determinado por los niveles de ADP. Bajo condiciones fisiol6gicas la actividad respiratoria mitocondrial se alterna entre los estados energ6ticos 3 y 4, definidos por Chance and Williams. El estado 4 o de reposo se da cuando la carga de energ6a en las c6lulas es alta y los niveles de ADP son bajos. Esta situaci6n limita el transporte de electrones en el C_I , la tasa de respiraci6n es lenta y no se produce ATP. Aun as6, el $\Delta\psi_m$ es alto porque no se consume en la s6ntesis de ATP. El estado 3 o activado por ADP se da cuando la carga de energ6a en las c6lulas es baja y los niveles de ADP son altos. Estas condiciones fisiol6gicas estimulan al C_I que aumenta el transporte de electrones increment6ndola tasa de respiraci6n y produciendo mayor cantidad de ATP para responder a las demandas energ6ticas. El $\Delta\psi_m$ es bajo porque se consume en la s6ntesis de ATP [77].

La se6alizacion por Ca^{2+} , originada en el citoplasma por estimulaciones fisiol6gicas, causa una sobrecarga de Ca^{2+} citos6lico que se acumula r6pidamente en la matriz mitocondrial utilizando el $\Delta\psi_m$. Este incremento del Ca^{2+} en la matriz mitocondrial modula la actividad de distintas enzimas que regulan directa o indirectamente la bioenerg6tica mitocondrial. El aumento del Ca^{2+} mitocondrial activa v6a fosforilaci6n 3 deshidrogenasas del ciclo de Krebs que activan la producci6n de ATP, activa quinasas que fosforilan al C_I para activar la CTE y activa fosfatasas que defosforilan al C_{IV} e impiden su inhibici6n alost6rica por ATP. Estos tres niveles de regulaci6n por el aumento del Ca^{2+} mitocondrial hacen que se aumente la producci6n de ATP para adaptar el metabolismo aer6bico al aumento de los requerimientos de la c6lula activa. Inversamente, unos niveles bajos de Ca^{2+} mitocondriales hacen que las fosfatasas defosforilen e inactiven el C_I , disminuyendo la producci6n de ATP, que incluso pueden llevar hasta el fallo energ6tico [81, 82, 84].

D6ficits de subunidades proteicas de todos los complejos, pero especialmente del C_I , son la causa de m6ltiples enfermedades por fallo energ6tico y estr6s oxidativo. As6 pues, se ha propuesto al C_I como una pieza clave en la regulaci6n de la bioenerg6tica

mitocondrial, controlando tanto la eficiencia de la OXPHOS como la tasa de consumo de oxígeno [77].

Como ya hemos visto la OXPHOS está estrechamente relacionada con la producción de ROS (pérdida de los supercomplejos), la integridad de las membranas mitocondriales (disipación del $\Delta\psi_m$), la apoptosis (apertura del PPTM) y los niveles de Ca^{2+} mitocondriales (activación de la producción de ATP) [77, 81].

5.3. Apoptosis

La mitocondria juega un papel central en la regulación de la muerte celular, incluyendo apoptosis y necrosis. Cuando un estímulo apoptótico alcanza la mitocondria se produce el ensamblaje de los componentes del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (PPTM), que en condiciones fisiológicas están dispersos realizando distintas funciones como VDAC, ANT y ciclofilina D. Este poro permeabiliza las MMI y MME y disipa el $\Delta\psi_m$, con la consiguiente disminución en la producción de ATP y el hinchamiento de la mitocondria debido a la entrada de agua. Esto provoca la rotura de la MME y la liberación del contenido del espacio intermembrana al citosol. El factor liberado más importante es el Cit c, y a que facilita la formación del apoptosoma y la activación de la caspasa-9 iniciadora de la cascada de apoptosis, que llevará a la célula a la muerte.

La alteración de las señales de Ca^{2+} que alcanzan a la mitocondria en asociación con diferentes condiciones patológicas, como el estrés oxidativo, pueden inducir una profunda alteración de la estructura de los orgánulos y su función y llevar a la célula a la muerte [85]. Un aumento del Ca^{2+} citosólico sostenido en el tiempo provoca la saturación de la concentración mitocondrial del Ca^{2+} que activa la formación del PPTM para la salida del Ca^{2+} de nuevo al citosol, la mitocondria se hincha y se activa la apoptosis [82]. Condiciones de estrés oxidativo estimulan la liberación del Ca^{2+} de la mitocondria por colapso del $\Delta\psi_m$ y la apertura del PPTM.

Pero también existen factores, como son las proteínas de la familia Bcl-2, que regulan la formación y apertura del PPTM impidiendo la entrada en apoptosis. Bcl-2 inhibe la formación del PPTM estabilizando la membrana mitocondrial, aumentando la capacidad tamponadora de Ca^{2+} y protegiendo al $\Delta\psi_m$ de diversos estímulos [81].

5.4. Autofagia

Una mitocondria defectuosa en la que la síntesis de ATP está comprometida comienza a producir grandes cantidades de ROS y libera proteínas que participan en las vías de muerte celular. Las células han desarrollado un mecanismo de defensa frente a la mitocondria aberrante que puede causar daño a la célula. Este mecanismo implica el secuestro selectivo y la subsiguiente degradación de la mitocondria disfuncional antes de que cause la activación de la muerte celular. Esto ocurre a través de un proceso conocido como autofagia mitocondrial o mitoautofagia [86].

La autofagia es una vía de degradación celular esencial para la neurona, con gran implicación en el mantenimiento de proteínas y mitocondrias saludables. Las proteínas y mitocondrias dañadas son ubiquitinadas para su degradación. La proteína p62 reconoce la señal de ubiquitinas en la mitocondria y se une al LC3 para formar el autofagosoma (**Figura 10**).

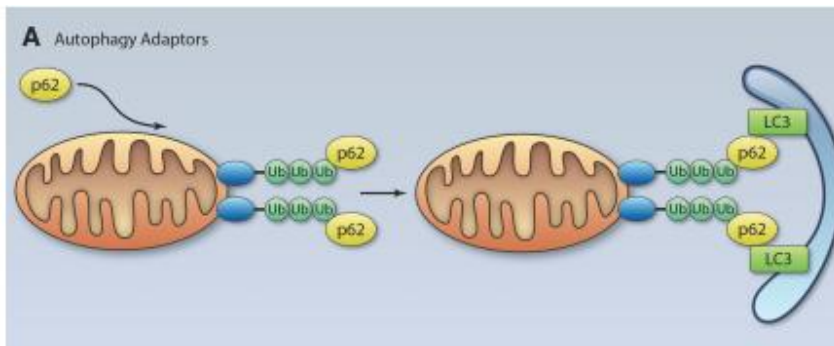


Figura 10. Renovación de la mitocondria vía adaptadores de la autofagia.

La proteína p62 interacciona con las proteínas ubiquitinadas de la mitocondria. El complejo es atado al autofagosoma a través de la interacción entre p62 y LC3. Adaptado de Kubli y Gustafsson (2012) [86].

En la neurona sensitiva el flujo autofágico depende de forma conjunta de la biogénesis, de la maduración y de la dinámica del autofagosoma, implicando un proceso espacial y temporalmente regulado a lo largo del axón (**Figura11**). La formación del autofagosoma ocurre en la zona distal y se transporta retrógradamente hacia la zona proximal del soma, donde los lisosomas son más prevalentes, para formar el autofagolisosoma y catalizar la degradación del contenido del autofagolisosoma [87]. La inducción del flujo autofágico normalmente se acompaña de una elevación de los niveles de LC3II y una reducción de los niveles de p62. Sin embargo, cuando el flujo autofágico no es correcto, se acumulan intermediarios de la autofagia como p62 y vacuolas parecidas a los autofagosomas y autofagosomas/autolisosomas [87, 88]. La acumulación de intermediarios de la autofagia se observa frecuentemente en axones distróficos y en esferoides axonales en modelos de daño neuronal y en muchos tipos de enfermedades neurodegenerativas. Se acumulan junto con proteínas agregadas y citoesqueleto colapsado, y son indicativos de un fallo de la autofagia y de un fallo en el transporte axonal [88, 89].

Defectos en el transporte axonal y/o en la autofagia son suficientes para inducir neurodegeneración, ya que tanto el tráfico de la mitocondria como su degradación son importantes para el mantenimiento de la salud neuronal y mitocondrial [91]. En enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Huntington y ELA se ha descrito que tanto un defecto en la autofagia como un exceso de inducción de la autofagia causan degeneración axonal, por desequilibrar la homeostasis de proteínas y membranas [88, 90].

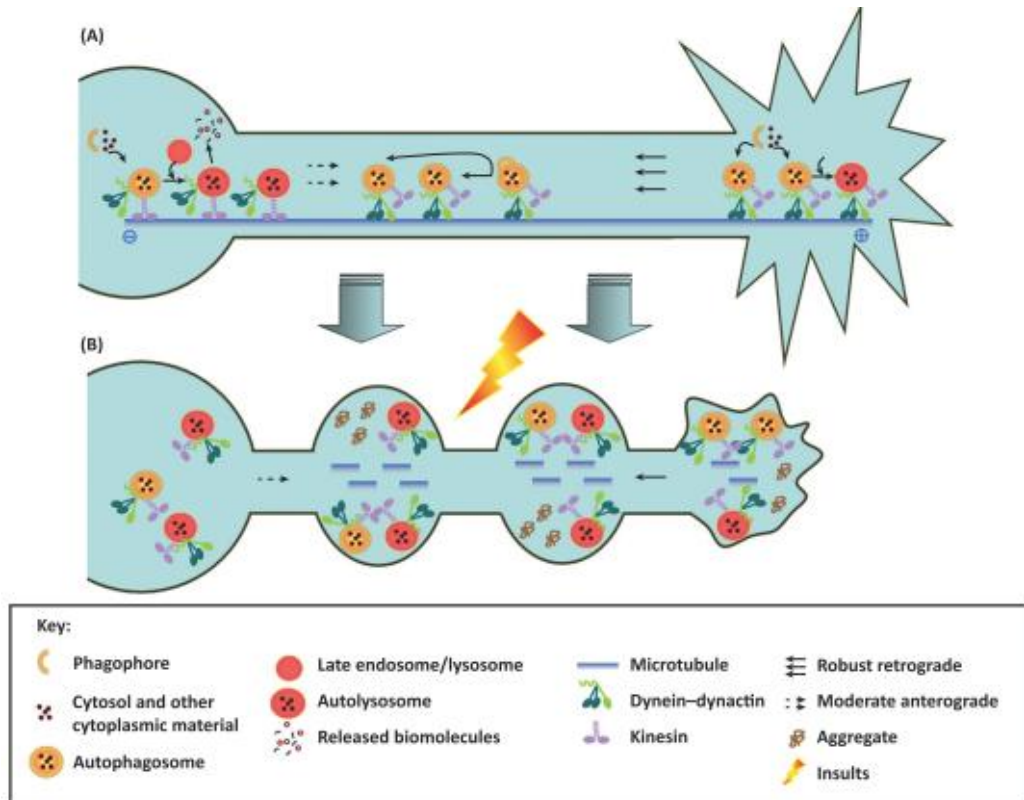


Figura 11. Biogénesis, maduración y dinámica del transporte autofagosomas y autolisosomas en axones sanos y degenerados.

A) Bajo condiciones normales los autofagosomas se forman en los finales distales de los axones sanos. Se vuelven acidificados (maduros) e inician un transporte retrógrado a lo largo del axón que es dependiente de los microtúbulos y del complejo dineína/dinactina. En los autofagosomas maduros o autolisosomas se inicia la degradación proteolítica de los sustratos autofágicos. **B)** Tras determinados daños neuronales los autofagosomas aumentan excediendo la capacidad de aclaramiento. Como resultado, los autofagosomas/autolisosomas se acumulan en los esferosomas axonales, en los que también se detectan agregados de proteínas y citoesqueleto colapsado. Adaptado de Yang y colaboradores (2013) [89].

5.5. Homeostasis del calcio

La señalización por Ca^{2+} es un mecanismo esencial de la transducción de señales celulares que ocurren a través de una serie de oscilaciones de la concentración del Ca^{2+} citoplasmático, $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Estos cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ regulan, en una escala de tiempo desde milisegundos a días, muchas de las funciones de células especializadas como contracción muscular, secreción hormonal, diferenciación y proliferación celular, transcripción, migración y apoptosis. La regulación en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ viene dada por un patrón espaciotemporal, donde cada evento unitario son microdominios de Ca^{2+} generados por la apertura de los canales de Ca^{2+} de la membrana plasmática (MP) y/o de los canales de liberación de Ca^{2+} del retículo endoplásmico (RE) [85, 90, 91].

Los canales de calcio de la MP son de cuatro tipos: VOC (*Voltage-gated Ca²⁺ channel*), ROC (*Receptor-operated Ca²⁺ channel*), SOC (*Store-operated Ca²⁺ channel*) y TRPC (*Transient receptor potential canonical channels*).

En las células excitables la entrada de Ca²⁺ se realiza principalmente a través de los canales de Ca²⁺ voltaje dependientes (VOC) de la MP para generar y propagar el impulso nervioso, pero también a través de los canales de Ca²⁺ operados por receptores (ROC), que median la entrada de Ca²⁺ en respuesta a la activación de los receptores acoplados a proteína Gq/11 (GPCR, *G protein coupled receptor*).

En las células no excitables la entrada de Ca²⁺ se realiza a través de los ROC y/o de los canales operados por almacenes (SOC), que median la entrada de Ca²⁺ en respuesta a la depleción de Ca²⁺ del RE en un proceso denominado SOCE (*Store-operated calcium entry*).

Aunque el SOCE se describió en células no excitables numerosos estudios recientes han establecido la existencia de SOC y SOCE en células neuronales también [84, 91]. Los canales ROC, SOC y el mecanismo SOCE, encargados de la señalización por Ca²⁺ intracelular, están representados en la **Figura 12**. Bajo condiciones fisiológicas la entrada de Ca²⁺ a través de los canales ROC y SOC ocurren mediante la señalización de PLCβ y PLCγ/IP3. La unión del ligando, p.ej. neurotransmisores, al GPCR activa a la fosfolipasa C β (PLCβ) que produce los segundos mensajeros inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). El DAG activa los canales TRPC para la entrada de Ca²⁺ extracelular, actuando como un ROC o canal operado por receptores. El IP3 dispara la liberación de Ca²⁺ del RE al citosol, a través de los receptores de IP3 (IP3R). El vaciado de los almacenes de Ca²⁺ del RE induce la apertura de los canales de Ca²⁺ tipo SOC de la MP y la entrada de Ca²⁺ desde el medio extracelular. Este flujo de Ca²⁺ permite el rellenado de los almacenes del RE mediante el mecanismo llamado SOCE [85].

Los efectores del SOCE son STIM1, Orai1 y SERCA. STIM1 es el sensor de Ca²⁺ del RE y Orai1 es la subunidad formadora del poro del canal SOC en la MP, o también llamado canal CRAC (*Ca²⁺-release-activated Ca²⁺*). Cuando el RE se vacía de Ca²⁺ STIM1 oligomeriza y migra a las uniones RE-MP para interactuar con Orai1 y abrir los canales SOC que permiten la entrada del Ca²⁺. El rellenado del RE es efectuado por la bomba SERCA (*Sarco(Endo)plasmic Reticulum Calcium ATPase*) y permite el rellenado supereficiente de los almacenes de Ca²⁺ del RE con el Ca²⁺ entrante. El correcto rellenado de los almacenes es totalmente necesario para asegurarnos una adecuada respuesta en el siguiente estímulo. La inactivación del canal SOC se produce principalmente cuando los niveles de Ca²⁺ alrededor del canal se incrementan, más que por la sobrecarga de Ca²⁺ en toda la célula, y depende de STIM1 y de la unión de la calmodulina a Orai1.

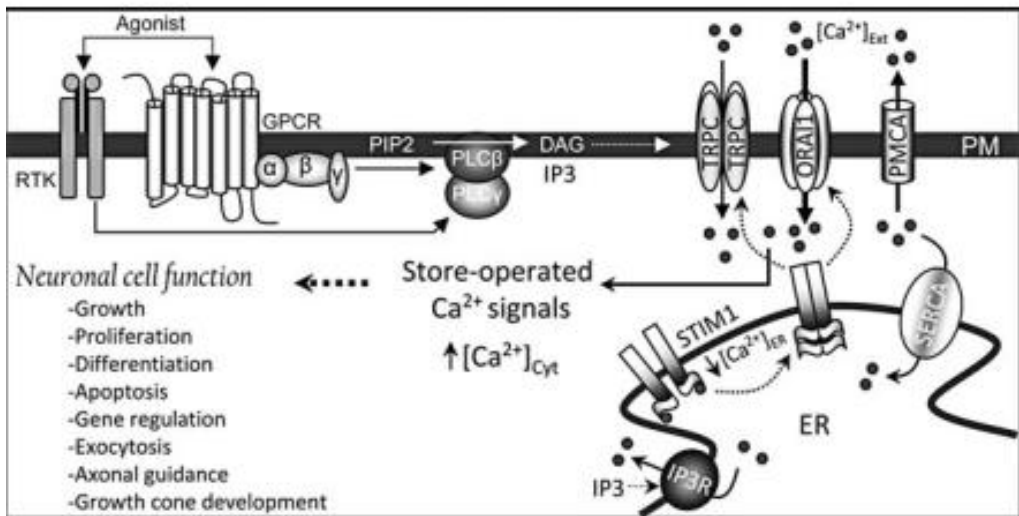


Figura 12. Entrada de Ca²⁺ operada por receptores (ROC) y operada por almacenes (SOCE) y su implicación en las funciones neuronales.

A la izquierda del dibujo se observa que la activación de los receptores GPCR y TK de la MP resulta en la generación de los mensajeros celulares IP3 y DAG. DAG activa la entrada de Ca²⁺ a través de los ROC o TRPC. El IP3, a través del IP3R del RE, vacía los almacenes de Ca²⁺ del RE. El vaciado de los almacenes provoca la activación de la vía STIM1-Orai1 que permite la entrada de Ca²⁺ a través de los SOC o CRAC. El flujo de Ca²⁺ entrante sirve para rellenar el RE de Ca²⁺, a través de la bomba SERCA, completando el proceso del SOCE. Además el aumento de la [Ca²⁺]_i también sirve como señalizador para regular funciones neuronales. Adaptado de Groschner y colaboradores (2012) [85].

El SOCE fue originalmente propuesto como un mecanismo para asegurar el relleno de los almacenes intracelulares después de cada evento de liberación de Ca²⁺, esencial para la integridad funcional y la supervivencia celular. Pero recientemente ha emergido la idea de que el flujo de Ca²⁺ por SOCE también se puede propagar por el citoplasma y entrar a orgánulos como la mitocondria o el núcleo, actuando como una vía de señalización que modula funciones neuronales tan importantes como el crecimiento, la diferenciación, la regulación génica, la guía axonal y la neurotransmisión. Alteraciones en el SOCE están envueltas en la patogénesis de muchas enfermedades como inmunodeficiencias, autoinmunidad, alergia, miopatía congénita, enfermedad inflamatoria y en trastornos neurológicos [84, 85, 91].

La mitocondria es esencial en la homeostasis celular del Ca²⁺ debido a que aporta el ATP necesario para el transporte activo primario del Ca²⁺ y debido a que tiene una gran capacidad de recaptación del Ca²⁺ citosólico. El aumento de Ca²⁺ en la matriz mitocondrial activa la bioenergética mitocondrial para proveer la energía requerida por las demandas celulares. Por ello la mitocondria se acumula en los sitios de la célula donde el consumo de ATP y la [Ca²⁺]_i son altos [81].

La entrada de Ca^{2+} a la mitocondria se realiza a través de los transportadores: canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC, *voltage-dependent anion channels*) en la membrana mitocondrial externa (MME) y uniportador de Ca^{2+} mitocondrial (MCU, *mitochondrial calcium uniporter*) en la MMI. La salida de Ca^{2+} de la mitocondria tiene lugar por dos intercambiadores de la MMI: el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial (mNCX, *mitochondrial $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger*) y el intercambiador $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ (mHCX, *mitochondrial $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$*). La mitocondria tiene una gran capacidad recaptadora del Ca^{2+} debido a la alta capacidad de la MCU para introducir el Ca^{2+} citosólico en la mitocondria, al $\Delta\psi_m$ y a la habilidad de los fosfatos inorgánicos para quelar el Ca^{2+} en la matriz mitocondrial (**Figura 13**) [82, 85].

El SOCE es un proceso enormemente dependiente de la mitocondria, debido al aporte de ATP e intermediarios metabólicos, pero principalmente debido a su capacidad de recaptación del Ca^{2+} . La mitocondria secuestra el Ca^{2+} que está entrando en el proceso de SOCE, impidiendo que este Ca^{2+} autoregule los canales SOC y se inactiven. Por lo tanto, la recaptación de Ca^{2+} mitocondrial parece ser la clave por la que el proceso de SOCE es prolongado por la mitocondria. Además la mitocondria vuelve a sacar todo este Ca^{2+} que está recaptando a través del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mNCX, que al estar pegado a las bombas SERCA del RE, hace que parte de este Ca^{2+} mitocondrial sirva para rellenar el RE (**Figura 13**).

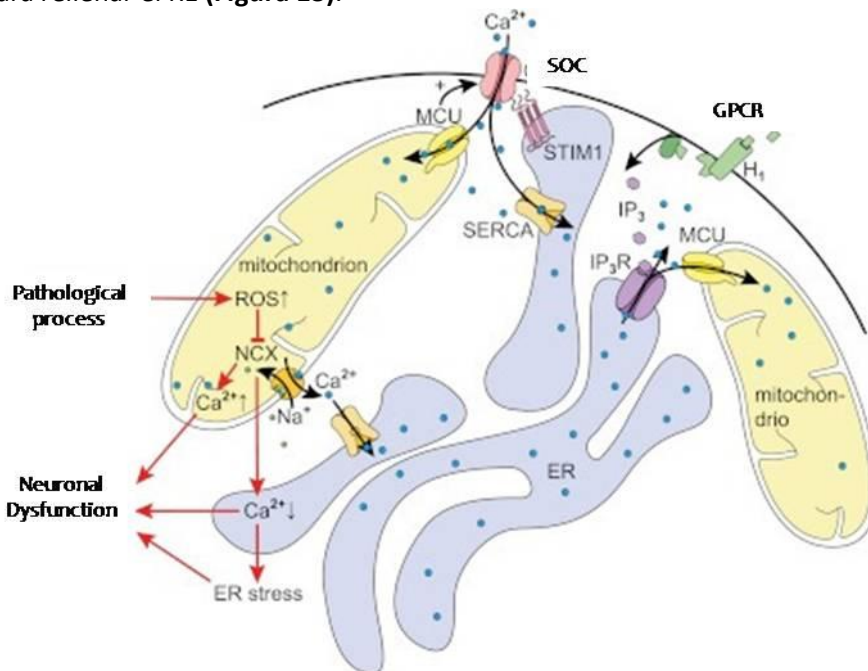


Figura 13. Implicación de la mitocondria en la señalización por Ca^{2+} transorgánulos después de la liberación intracelular del Ca^{2+} por IP_3 y del SOCE.

Las flechas negras indican los movimientos de Ca^{2+} bajo condiciones fisiológicas en respuesta a la estimulación con GPCR, que a través del IP_3 se produce el vaciado de Ca^{2+} del RE y la activación del SOCE. La mitocondria tampona el aumento del Ca^{2+} citosólico mediante MCU tras la salida de Ca^{2+} del RE y en la

reentrada de Ca^{2+} mediante el SOCE, permitiendo la prolongación del SOCE. Además la mitocondria vuelve a sacar el Ca^{2+} , que ha recaptado en el SOCE, a través de la NCX permitiendo un relleno de los almacenes de RE de Ca^{2+} . Las líneas rojas remarcan procesos patológicos que causan una excesiva producción de ROS mitocondrial, como p.ej. el déficit de frataxina, que a su vez alteran la homeostasis del Ca^{2+} en el resto de orgánulos causando una disfunción neuronal. Adaptado de Groschner y colaboradores (2012) [92].

Por lo tanto, el SOCE es un proceso enormemente dependiente de una mitocondria no comprometida. La despolarización mitocondrial atenúa la capacidad de recaptación de Ca^{2+} y consecuentemente provoca la inhibición prematura del SOCE, pudiendo comprometer las respuestas celulares normales [85]. Se ha descrito en pacientes con defectos en el C_i de la CTE que presentan una disminución del $\Delta\psi_m$ y de la producción de ATP, junto con una disminución de la recaptación de Ca^{2+} por la mitocondria [93]. El estrés oxidativo también provoca una disminución del Ca^{2+} mitocondrial [82] y además puede dañar las cisteínas reactivas de STIM1 y Orai, comprometiendo la maquinaria del SOCE [90]. Un SOCE defectuoso puede disminuir las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y vaciar los almacenes intracelulares de Ca^{2+} , disminuyendo la señalización de funciones neuronales tan importantes como la transmisión sináptica, la plasticidad neuronal, el crecimiento axonal y la regulación génica [85, 94].

6. Receptores acoplados a proteína G (GPCR) y proteínas G

Los GPCR son una gran familia de receptores transmembrana, compuesta por unos 1000 miembros, y median las respuestas fisiológicas a multitud de ligandos como hormonas, factores de crecimiento, neurotransmisores y estímulos sensitivos, como el olor y la luz. Por lo que están implicados en procesos fisiológicos tan importantes como la transducción sensitiva, la comunicación célula-célula, la transmisión neuronal y la señalización hormonal. Los GPCR perciben multitud de señales extracelulares y las transducen a las proteínas G, las cuales a su vez las transducen a los efectores apropiados. De esta forma la señal primaria o estímulo extracelular se transporta al interior de la célula a través de una triple transducción de la señal receptor/transductor/efector. Esta señalización a través de los GPCR es altamente modulable y depende del contexto celular [95].

Todos los GPCR interactúan con la proteína G heterotriméricas ($\text{G}\alpha\beta\gamma$) que se componen de tres subunidades alfa, beta y gama. La unión del ligando al GPCR le hace cambiar de conformación y permite el cambio de GDP a GTP en la subunidad $\text{G}\alpha$, la cual se activa y se separa del dímero $\text{G}\beta\gamma$. Cuando ambas subunidades están libres activan sus efectores vía abajo. Después de la propagación de la señal la propia subunidad $\text{G}\alpha$ -GTP hidroliza el GTP a GDP para inactivarse y reasociarse con el dímero $\text{G}\beta\gamma$, para formar el complejo heterotrímico inactivo (**Figura 14**) [95].

Hay cuatro tipos de subunidad $G\alpha$ y cada una activa una determinada vía de señalización: i) $G\alpha_s$ que activa a la adenilato ciclasa (AC) para aumentar los niveles de cAMP y activar a la proteína quinasa A (PKA); ii) $G\alpha_i$ que inhibe la AC y disminuye el cAMP, pero también se asocia con el dímero $G\beta\gamma$ para abrir canales de K^+ ; iii) $G\alpha_q$ es una familia multigénica compuesta por 4 genes: $Gnaq$, $Gna11$, $Gna14$, $Gna15$. Todas activan a la fosfolipasa C beta ($PLC\beta$) que aumenta IP3 y DAG para movilizar los almacenes de Ca^{2+} intracelulares y activar a la proteína quinasa C (PKC), respectivamente; iv) $G\alpha_{12}$ y $G\alpha_{13}$ que activan a la familia Rho.

Las proteínas $G\beta\gamma$ son reguladoras negativas de la actividad de la subunidad $G\alpha$, aunque también pueden activar directamente a la $PLC\beta$ y canales iónicos de la MP.

Las subunidades $G\alpha$ y $G\beta\gamma$ a través de la activación de los efectores como canales iónicos, AC, guanilato ciclasa (GC) y $PLC\beta$ producen la activación de los segundos mensajeros como Ca^{2+} , cAMP, cGMP e IP3 y DAG. A partir de aquí la transducción de la señal puede ser regulada por las proteínas quinasas (PK) y las fosfolipasas (PL) en el citoplasma. Las dianas de la señal pueden ser enzimas, receptores intracelulares, vehículos de transporte especial y factores de transcripción, los cuales controlan en último término la expresión génica [95].

La desensibilización del sistema de señalización acoplado a proteína G puede implicar el propio receptor, la proteína G asociada con el receptor y/o el efector.

Las proteínas $G\alpha_q$ y $G\beta\gamma$ señalizan a través de la activación de $PLC\beta$ /DAG-IP3/PKC. Hay tres isoformas de $PLC\beta$ y todas ellas hidrolizan el fosfatidilinositol 4.5-bisfosfato (PIP2) produciendo dos segundos mensajeros, IP3 y DAG. El DAG activa la PKC implicada en funciones de regulación y el IP3 moviliza los almacenes de Ca^{2+} intracelulares. El Ca^{2+} movilizado, a su vez, también activa a la PKC. La PKC es una quinasa específica de serina y treonina, que fosforila una amplia variedad de proteínas en función del GPCR activado. La familia PKC es muy amplia y cada miembro de la familia tiene un perfil de expresión con una función distinta.

La proteína $G\alpha_s$ señaliza a través de la activación de la AC/cAMP/PKA. La activación de la AC aumenta los niveles de cAMP y éste activa a la PKA al disociar los dímeros de las subunidades reguladoras de las subunidades catalíticas libres de la PKA. Las subunidades catalíticas libres de la PKA transducen la señal del cAMP a través de la fosforilación de diferentes proteínas diana. Como por ejemplo a través de la fosforilación del factor de transcripción CREB que hace que se una a un motivo o sitio de unión llamado CRE (*cAMP response elements*) y aumenta la transcripción de genes como c-fos, BDNF y neuropéptidos.

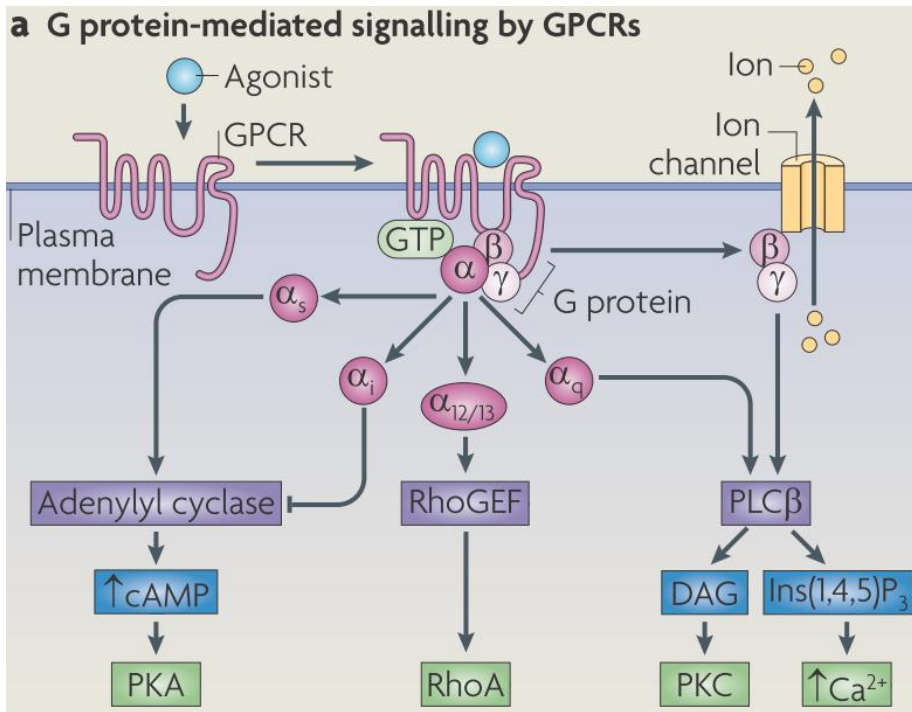


Figura 14. Mecanismos canónicos de la señalización GPCR.

Arriba a la izquierda podemos ver cómo la unión del agonista al receptor GPCR cambia su conformación, permitiendo la interacción con las proteínas G heterodiméricas y provocando la disociación de las subunidades $G\alpha$ (círculo rosa) y $G\beta\gamma$ (círculo rosa claro). Hay múltiples subtipos de subunidad $G\alpha$, incluyendo $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ y $G\alpha_{12/13}$ (círculo rosa) que se unen y regulan la actividad de efectores como la AC, PLC β y RhoGEF (recuadro morado). Esta modulación de los efectores directamente o por la generación de segundo mensajeros como cAMP, DAG o IP $_3$ (recuadro azul), modulan otros efectores más abajo como la PKA y PKC (recuadro verde). La subunidad $G\beta\gamma$ (círculo rosa claro) puede regular ciertos efectores como canales iónicos de la MP y efectores como la PLC β (recuadro morado). Adaptado de Ritter y Hall (2009) [96].

6.1. Familia B o de clase II de GPCR

La familia B o de clase II de GPCR juegan un papel central en la regulación de la función y la plasticidad de los circuitos neuronales en el SN y en la regulación de la supervivencia neuronal. Están implicados en la transmisión sináptica y plasticidad, en el comportamiento, aprendizaje, memoria, emociones y en las funciones motoras y sensitivas. Muchos de los neuropéptidos que activan los GPCR de tipo II, como secretina, GLP-1 y GLP-2, GHRH, PACAP, CRH, VIP, PTH y péptidos relacionados con calcitonina, promueven la supervivencia neuronal por aumento de la resistencia celular a los daños oxidativos, metabólicos y excitotóxicos. Por todo ello la señalización por GPCR de tipo II ha sido relacionada con la patogénesis de condiciones neurodegenerativas como infarto y enfermedad de Alzheimer, Parkinson y Huntington [97].

Especialmente el polipéptido activador de la adenilato ciclasa o PACAP ha sido descrito recientemente como un péptido bioactivo pleiotrópico que se distribuye ampliamente en el SNC y SNP y actúa como neurotransmisor, neuromodulador y factor neurotrófico a través de tres receptores PAC1R, VPAC1 y VPAC2. El receptor PAC1R actúa como receptor selectivo de PACAP y activa las dos vías de señalización $G\alpha s/AC/cAMP$ y $G\alpha q/PLC\beta/IP3$ (**Figura 15**).

La expresión de PACAP aumenta después de un daño en las neuronas periféricas, predominantemente en las propioceptivas, para promocionar su efecto neuroprotectivo y neuritogénico [98-100]. Y el tratamiento con PACAP en modelos de patologías del SNC como isquemia cerebral, Parkinson y Alzheimer consigue reproducir este efecto neurotrófico y neuroprotectivo [101].

Hay que destacar que la activación mitocondrial juega un papel muy importante en esta inducción del crecimiento neurítico que ejerce el PACAP a través del PAC1R, e implica a $PGC1\alpha$ y PKA. De forma que la despolarización mitocondrial y la disminución de $PGC1\alpha$ atenúan el crecimiento neurítico en las células tratadas con PACAP [102].

La supervivencia celular mediada por PACAP viene dada vía AC que fosforila ERK y aumenta la expresión de c-fos. PACAP, a través de la activación AC/cAMP, protege frente a la neurotoxicidad del glutamato y frente al daño por β -APP, lipopolisacárido y 6-hidroxidopamina. Además suprime la neuroinflamación en infarto y trastornos neurológicos [84]. El papel neuroprotector del PACAP en las enfermedades neurodegenerativas se basa en la inducción de la expresión transcripcional de genes antiapoptóticos, como BDNF y Bcl-2. Además de inhibir las respuestas de la señalización apoptótica, incluyendo la generación de ROS y la expresión de factores apoptóticos como Bax, impidiendo la liberación de Cit c de la mitocondria y la activación de caspasa-3 [101]. Además PAC1R, vía $PLC\beta$, regula los niveles de Ca^{2+} para modular la liberación de neurotransmisores y la función de los receptores de los neurotransmisores.

Por todas estas razones se ha propuesto la vía de señalización PACAP/PAC1R como punto clave en el desarrollo de futuras estrategias terapéuticas en las enfermedades neurodegenerativas.

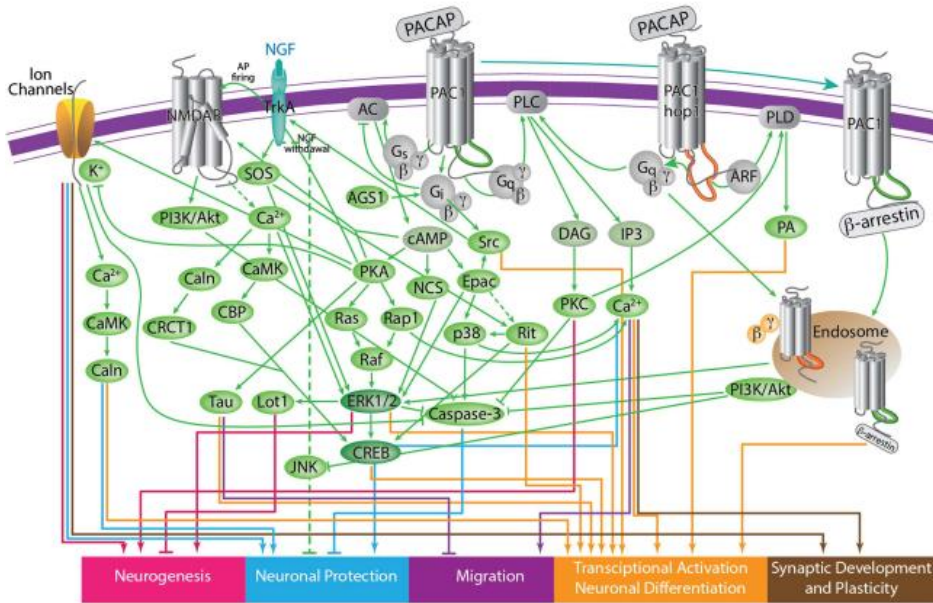
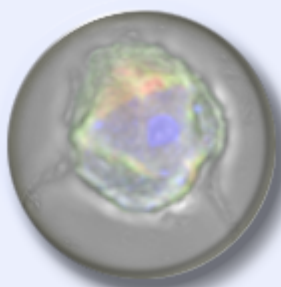


Figura 15. Esquema de las cascadas de señalización mediadas por el receptor PAC1R que concluyen en una gran variedad de funciones neuronales.

La vía PAC1R/cAMP/PKA/ERK_{1/2}/CREB media el efecto neuroprotector, neurotrófico y del crecimiento neurítico. La vía PAC1R/cAMP/Epac/Rit regula la diferenciación neuronal. La vía PAC1R/PLC/IP₃-Ca²⁺ y DAG-PKC participa en la neurogénesis, plasticidad sináptica y neuroprotección. El receptor PAC1R es un mediador de la transcripción genética, de la diferenciación neuronal y del desarrollo sináptico. Adaptado de Blechman y Levkowitz (2013) [103].

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



1. Hipótesis

La FRDA es una enfermedad caracterizada por la afectación primaria del ganglio dorsal. La falta de frataxina no afecta por igual a todos los tipos neuronales del ganglio dorsal, siendo las neuronas propioceptivas las más dañadas. Esto nos lleva a cuestionarnos porque este tipo neuronal es más sensible a una deficiencia de frataxina.

Esta tesis doctoral se centrará en la investigación de la biología celular de frataxina en neuronas sensitivas del ganglio dorsal y las consecuencias fisiopatológicas del déficit de frataxina en el modelo murino YG8R. La caracterización molecular y bioquímica de las neuronas sensitivas, especialmente de las propioceptivas, en condiciones fisiológicas y de déficit de frataxina, permitirá identificar nuevos marcadores selectivos de esta población neuronal e identificar aquellos mecanismos fisiopatológicos que provocan la neurodegeneración primaria del ganglio dorsal en la FRDA. Además, es interesante comprobar cómo estos procesos afectan a la neurona, distinguiendo dos localizaciones: el soma y el axón. La respuesta a estas cuestiones nos ayudará a comprender el papel de la frataxina en los mecanismos moleculares relacionados con los procesos de neurodegeneración.

Teniendo en cuenta lo anterior, este trabajo basa sus objetivos en la siguiente hipótesis:

En base a la distinta afectación de las neuronas sensitivas por el déficit de frataxina planteamos que las neuronas propioceptivas tienen mecanismos moleculares específicos que las hacen más vulnerables en este contexto a los procesos de neurodegeneración. Y la vulnerabilidad en la propia neurona frente al déficit de frataxina será diferente en el axón o en el soma, debido tanto por sus diferencias morfológicas como funcionales.

2. Objetivos

Objetivo 1. Identificación de nuevos marcadores específicos de neuronas propioceptivas del ganglio dorsal

1.1. Aislamiento de la subpoblación neuronal propioceptiva del ganglio dorsal

1.2. Estudio de los perfiles de expresión génica

1.3. Validación de nuevos marcadores específicos de neuronas propioceptivas del ganglio dorsal

Objetivo 2. Estudio fisiopatológico del déficit de frataxina en el modelo murino YG8R

2.1. Caracterización fenotípica del modelo FRDA

2.2. Estudio de la fisiopatología tisular del déficit de frataxina

- Estudio de la expresión de frataxina en tejidos neuronales y de los mecanismos de neurodegeneración

2.3. Estudio de la neurofisiopatología celular del déficit de frataxina

- Fenotipado celular de las neuronas sensitivas del ganglio dorsal en cultivo primario en el déficit de frataxina

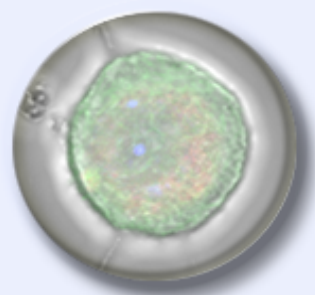
Objetivo 3. Identificación de los mecanismos moleculares implicados en la neurodegeneración del ganglio dorsal en el déficit de frataxina

3.1. Estudio del perfil proteómico del ganglio dorsal de ratón YG8R

3.2. Búsqueda de mecanismos moleculares por los que el déficit de frataxina causa la degeneración de las neuronas propioceptivas del ganglio dorsal

Objetivo 4. Búsqueda de nuevas aproximaciones terapéuticas en la ataxia de Friedreich

MATERIALES Y MÉTODOS



1. Material biológico

1.1. Animales de experimentación

Los experimentos incluidos en el objetivo 1 para la identificación de nuevos marcadores de neurona propioceptiva se realizaron en animales de 12 meses de edad de la cepa de ratón de fondo puro C57BL/6J (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine).

Los experimentos incluidos en el objetivo 2, 3 y 4 para el estudio fisiopatológico del déficit de frataxina y los mecanismos moleculares implicados en la neurodegeneración se realizaron en animales de 18-24 meses de edad en el modelo murino deficiente en frataxina YG8R “rescatado”, con genotipo (Fxn^{-/-}, FXN⁺), y nomenclatura de cepa B6.Cg-Fxn^{tm1Mkn}Tg(FXN)YG8Pook/J (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine). Como control se utilizó la cepa de ratón de fondo puro C57BL/6J.

El número total de animales utilizados en la experimentación que reúne esta tesis doctoral es de 47 ratones C57BL/6J, 40 ratones YG8R y 31 ratones YG8YG8R. De forma puntual, para el estudio de la supervivencia y del peso corporal del modelo murino de FRDA, se utilizaron los datos de todos los animales de la colonia, por lo que el número total de animales utilizados en este caso es de 219 ratones C57BL/6J, 162 ratones YG8R y 97 ratones YG8YG8R.

Los ratones fueron alojados en cajas abiertas convencionales con cama de serrín, con algodón para hacer los nidos, con ciclos de 12 horas de luz - oscuridad, 20-23°C y 45-60% de humedad. Los ratones dispusieron de comida y agua a demanda. Todos los procedimientos fueron llevados a cabo de acuerdo con el Comité de ética del CSIC.

1.2. Obtención de las muestras de tejidos de ratón

Las muestras biológicas murinas se obtuvieron tras eutanasia por dislocación cervical y disección de las estructuras neurológicas de interés en la FRDA como son el ganglio dorsal, las raíces espinales (raíz dorsal, raíz ventral y zona proximal mixta del nervio espinal), las columnas posteriores de la médula espinal y el tronco del encéfalo. Tras su obtención se congelaron inmediatamente en N₂ líquido y se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

1.3. Cultivos primarios de ganglio dorsal

El cultivo primario de neurona sensitiva se obtuvo mediante la disección y disgregación enzimática de los ganglios dorsales murinos. Se realizó la disección de 50 ganglios dorsales por ratón que se recogieron en medio L15 (Sigma-Aldrich), eliminándose las raíces espinales. Se disgregaron enzimáticamente durante 30 minutos a 4°C, seguido de 60 minutos más a 37°C, con 2 mg/mL de colagenasa (Worthington), y se continúa la disgregación enzimática incubando durante 30 minutos a 37°C con 0,05% tripsina (Sigma). Se obtuvo entre 50.000 - 80.000 células por ratón en 1 ml de medio definido (F12 de Ham suplementado con glutamina 2 mM, 0,35% Albumax (Invitrogen), progesterona 60 ng/ml, putrescina 16 ug/mL, L-tiroxina

400 ng/ml, selenito de sodio 38 ng/ml, tri-yodo-tironina 340 ng/ml, penicilina 60 µg/ml, estreptomycin 100 µg/ml y suplementado con NGF, BDNF y NT-3 a 10 ng/ml y AraC 5 µM). Las neuronas se sembraron a la concentración deseada en el medio definido en placas de 24 pocillos (Sarstedt) con cubreobjetos de 12 mm de diámetro pretratados con poli-DL-ornitina (0,5 mg/ml en tampón borato toda la noche a temperatura ambiente) y laminina (20 µg/ml en solución salina balanceada de Hank o HBSS a 37°C en el incubador celular un mínimo 4 horas) [104]. Las neuronas sensitivas se cultivaron en incubador humidificado a 37°C y 5% de CO₂ durante 3-5 días *in vitro* (*div*).

2. Anticuerpos y tinciones

En la **tabla 1** y la **tabla 2** se muestran los anticuerpos primarios y secundarios y en la **tabla 3** se muestran las sondas y tinciones usados en las técnicas de inmunofluorescencia (IFI) y *western blot* (WB) a lo largo de este trabajo.

Tabla 1. Anticuerpos primarios empleados. Se indica el nombre y una breve descripción de la proteína que reconocen los anticuerpos y las condiciones en las que se han utilizado, tanto para IFI como para WB.

Anticuerpo primario	Proteína identificada y descripción	Casa comercial	Dilución (técnica)
ABL-93	LAMP2, proteína de membrana lisosomal	DSHB	1:500 (IFI)
Anti-cytochrome C	Cit C, proteína de la MMI	Invitrogen	1:1.000 (IFI)
Anti- α tubulin	α tubulina, microtúbulo neuronal	Sigma	1:1.000 (IFI)
Anti-actin	Actina, proteína del citoesqueleto	Sigma	1:1.000 (WB)
Anti-ATP synthase	ATP sintasa, subunidad α del C _v de la CTE	Invitrogen	1:1.000 (IFI)
Anti-catalase	Catalasa, enzima citosólica antioxidante	Sigma	1:1.000 (WB)
Anti-cathepsin D	Catepsina D, enzima lisosomal	Abcam	1:500 (IFI)
Anti-cytochrome C	Cit C, proteína de la MMI	BD Bioscience	1:1.000 (WB)
Anti-Frataxin	Frataxina humana, proteína de matriz mitocondrial	Immunological Science	1:500 (IFI)
Anti-LC3B	LC3B-I y LC3B-II, proteína de autofagosomas	Sigma	1:100 (IFI) 1:500 (WB)
Anti-NF160	Neurofilamento intermedio (NFM)	Sigma	1:250 (IFI)
Anti-OXPHOS Complex IV subunit II	COXII, subunidad II del C _{iv} de la CTE	Molecular Probes	1:500 (WB)
Anti-SQSTM1/p62	SQSTM1/p62, proteína adaptadora que une ubiquitina y LC3.	Abcam	1: 100
Anti-peripherin	Periferina, filamento intermedio tipo III	Millipore	1:2.000 (IFI)
Anti-SMI32	Neurofilamento pesado (NFH) no fosforilado	Covance	1:1.000 (IFI)
Anti-synaptophysin	Sinaptofisina, proteína de vesícula sináptica	Sigma	1:250 (IFI)
Anti-TOMM20	TOMM20, proteína de la MME	Sigma	1:1.000 (WB)
Anti-TrkA	TrkA, receptor de MP de neurona nociceptiva	Millipore	1:500 (IFI)

Anti-TrkB	TrkB, receptor de MP de neurona mecanorreceptiva	R & D	1:1.000 (IFI)
Anti-TrkC	TrkC, receptor de MP de neurona propioceptiva	R & D	1:1.000 (IFI)
Anti- β tubulin III	β -tubulinIII, microtúbulo específico de neurona	Sigma	1:1.000 (IFI)
			1:5.000 (WB)
Anti- β -APP	Precursor proteína beta-amiloide, marcador de vesículas de transporte	Abnova	1:500 (IFI)
Bcl-2	Bcl-2, proteína mitocondrial	Cell Signaling	1:500 (WB)
Bcl-2	Bcl-2, proteína mitocondrial	Santa Cruz	1:50 (IFI)
Cleaved caspasa-3 (Asp175)	Caspasa-3 cortada en la Asp175, activadora de apoptosis	Cell Signaling	1:500 (WB)
Complex IV subunit I	COXI, subunidad I del C _{IV} de la CTE	MitoScience	1:500 (WB)
CRHR2/CRF2	CRHR2, receptor de MP tipo 2 de la hormona corticotropa	Novus Biologicals	1:1.000 (IFI)
Galanin R1/GALR1	GALR1, receptor de MP tipo 1 de galanina	Novus Biologicals	1:50 (IFI)
Isolectina B4	α -D-galactosa, azúcar específico de neurona nociceptiva	Sigma	1:500 (IFI)
OPA-1	OPA-1, proteína de la MMI	BD Bioscience	1:150 (IFI)
			1:1.000 (WB)
PAC1R	PAC1R, receptor de MP tipo1 del PACAP	Novus Biologicals	1:100 (IFI)
Parvalbumin	Parvalbúmina, proteína citosólica específica de neurona propioceptiva	Abcam	1:1.000 (WB)
PV25	Parvalbúmina, proteína citosólica específica de neurona propioceptiva	Swant	1:5.000 (IFI)
RT97	Neurofilamento pesado (NFH) fosforilado	DSHB	1:100 (IFI)
SOD2	MnSOD, enzima de la matriz mitocondrial antioxidante	Abnova	1:1.000 (WB)

Tabla 2. Anticuerpos secundarios empleados. De cada anticuerpo secundario se indica la proteína que identifica, la especie en la que se ha desarrollado, el fluorocromo o peroxidasa que lleva conjugado y las condiciones en las que se han utilizado, tanto para IFI como para WB.

Anticuerpo secundario	Proteína identificada y descripción	Casa comercial	Dilución (técnica)
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor® 488 conjugate	IgG de conejo, conjugado con fluorocromo alexa fluor 488	Molecular Probes	1: 2.000 (IFI)
Goat anti-mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor® 488 conjugate	IgG de ratón, conjugado con fluorocromo alexa fluor 488	Molecular Probes	1: 2.000 (IFI)
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor® 633 conjugate	IgG de conejo, conjugado con fluorocromo alexa fluor 633	Molecular Probes	1: 2.000 (IFI)
Goat anti-mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor® 633 conjugate	IgG de ratón, conjugado con fluorocromo alexa fluor 633	Molecular Probes	1: 2.000 (IFI)

Rabbit anti-Rat IgG Secondary Antibody, Texas Red conjugate	IgG de rata, conjugado con fluorocromo texas red	Molecular Probes	1: 2.000 (IFI)
ECL Rabbit IgG, HRP-linked whole Ab	IgG de conejo, conjugado con peroxidasa	GE	1:5.000 (WB)
ECL Rabbit IgG, HRP-linked whole Ab	IgG de ratón, conjugado con peroxidasa	GE	1:5.000 (WB)

Tabla 3. Sondas y tinciones empleadas. Se indican las tinciones y sondas usadas en ensayos de fluorescencia de los cultivos primarios de ganglio dorsal *in vivo*, en IFI y en WB empleadas en este trabajo.

Tinción o sonda	Descripción	Casa comercial	Dilución (técnica)
DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol)	Es un marcador fluorescente del núcleo celular. Intercalante de DNA.	Sigma	1: 1.000 (IFI)
Mitotracker deep red	Es un marcador fluorescente de mitocondria. Entra y queda retenido en la mitocondria viva.	Molecular Probes	200 nM (<i>in vivo</i>)
MitoSOX	Es un marcador fluorescente de estrés oxidativo. Se une al anión superóxido.	Molecular Probes	3 μ M (<i>in vivo</i>)
JC-1	Cuantificación del $\Delta\psi_m$. Fluoresce en dos colores rojo o verde en función del $\Delta\psi_m$.	Molecular Probes	3 μ M (<i>in vivo</i>)
Fura-2	Es una sonda fluorescente que cuantifica los niveles citosólicos de calcio Ca^{2+} libre. Se une al Ca^{2+} citosólico.	Molecular Probes	5 μ M (<i>in vivo</i>)
Fluo-8	Es una sonda fluorescente que cuantifica los niveles citosólicos de calcio Ca^{2+} libre. Se une al Ca^{2+} citosólico libre.	Abcam	5 μ M (<i>in vivo</i>)
CMAC, t-BOC-Leu-Met	Sustrato tipo peptidasa específico para calpaína. El producto es fluorescente y cuantifica la actividad calpaína.	Molecular Probes	10 μ M (<i>in vivo</i>)
Ponceau S	Es un marcador colorimétrico de la carga de proteína en el WB. Se une a las proteínas desnaturalizadas.	Sigma-Aldrich	0,1% p/v (WB)

3. Amplificación y genotipado del modelo murino FRDA

3.1. Sistema de cruces de la colonia

El modelo murino FRDA se amplificó realizando el cruce entre individuos YG8R “rescatados” ($Fxn^{-/-}$, FXN^{+}), obteniendo ratones YG8R “rescatados” con una copia del transgén YG8 en hemizigosis ($Fxn^{-/-}$, FXN^{+}), denominados a partir de ahora YG8R, y ratones YG8R “rescatados” con dos copias del transgén YG8 en homocigosis ($Fxn^{-/-}$, $FXN^{+/+}$), denominados a partir de ahora YG8YG8R. Como control se utilizó la cepa pura de ratón C57BL/6J, fondo genético sobre el que se realizaron ambos modelos de mutantes [105-107]. El número de ratones YG8R en la descendencia presenta ratios mendelianos correctos, con un tiempo de vida normal, sobreviviendo hasta al menos los dos años de edad, de acuerdo con la descripción del modelo por su autor [14].

3.2. Sistema de genotipado

La identificación de la descendencia se realizó mediante el tatuado de las falanges. El aislamiento del DNA genómico se obtuvo a partir de fragmentos de cola de ratón postnatal de 8-10 días, utilizando "Mouse Tail DNA Purification Kit" y el sistema automatizado Maxwell 16 (Promega). Con cada muestra de DNA obtenida se efectuaron dos reacciones de PCR: A) una reacción de PCR múltiple del exón 4 de la frataxina murina (*Fxn*) para determinar la presencia del alelo normal y/o del alelo deleciónado (**Figura 16**) [36]; y B) una reacción de PCR para detectar la presencia del transgén de la frataxina humana YG8 (*FXN*) (**Figura 17**) [108]. Las **tablas 4 y 5** muestran los reactivos y los programas del termociclador, y la **tabla 8** las secuencias de los oligonucleótidos utilizados en la técnica de la PCR para realizar el genotipado de los ratones.

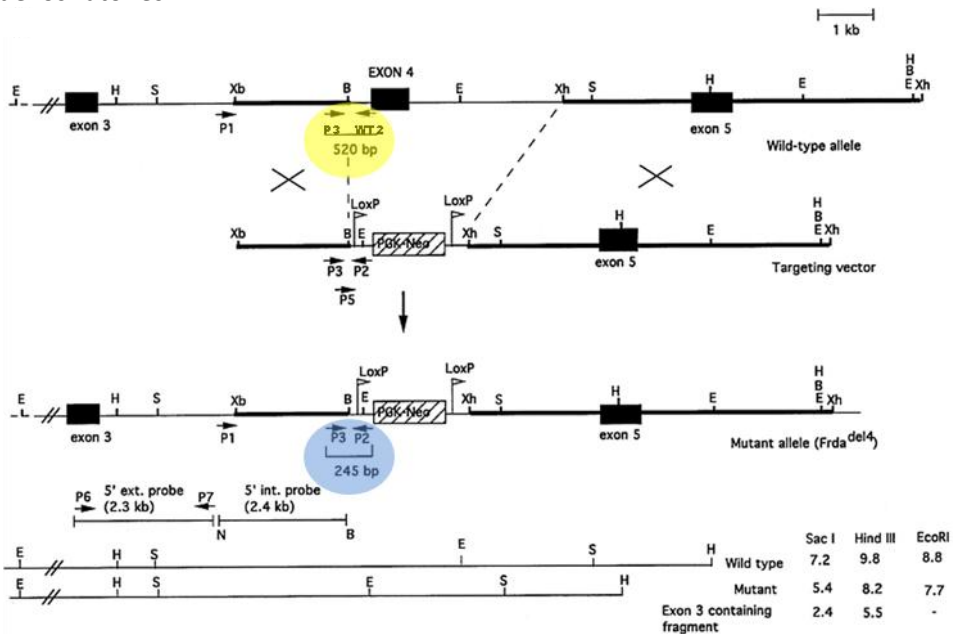


Figura 16. Esquema de la estrategia genética para deleciónar el exón 4 del gen de la frataxina murina.

Se muestran los sitios concretos donde hibridan las parejas de oligonucleótidos utilizados para la detección del alelo salvaje (círculo amarillo) y del alelo deleciónado (círculo azul). El oligonucleótido P3 forward hibrida antes del sitio *LoxP*, el oligonucleótido WT2 reverse hibrida antes del exón 4 y el oligonucleótido P2 reverse hibrida después del sitio *LoxP* y antes del cassette PGK-Neo insertados en el inicio del exón 4. Por lo tanto, el par P3-WT2 (círculo amarillo) amplifica el alelo normal que contiene el exón 4 y no presenta sitios *LoxP* ni cassette PGK-Neo. Y el par P3-P2 (círculo azul) amplifica el alelo deleciónado que contiene los sitios *LoxP* y el cassette PGK-Neo. Adaptado de Cossée y colaboradores (2000) [36].

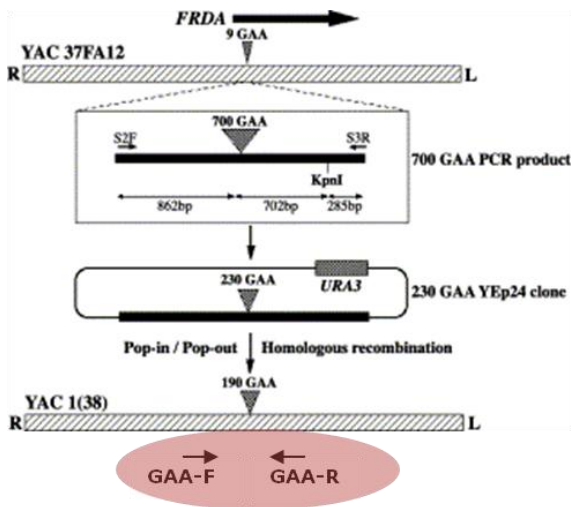


Figura 17. Esquema de la estrategia genética para aumentar las repeticiones GAA en el intrón 1 de la frataxina humana para conseguir el YAC clon 1(38), el cual fue utilizado para generar el ratón transgénico YG8.

Los oligonucleótidos iniciadores GAA-F y GAA-R hibridan en el brazo derecho e izquierdo del YAC, respectivamente, (círculo rosa) amplificando el gen completo de la frataxina humana junto con las repeticiones del triplete GAA. Adaptado de Pook y colaboradores (2001) [108].

Tabla 4. Reactivos y volúmenes utilizados en las PCR. A) Amplificación múltiple del alelo normal y/o el alelo deleciónado de la frataxina murina. B) Amplificación del transgén YG8.

A		B	
Componente	Volumen	Componente	Volumen
DNA genómico (80 ng/ µl)	2 µl	DNA genómico (80 ng/µl)	2 µl
dNTP mezcla (20 mM)	0,5 µl	dNTP mezcla (20 mM)	0,5 µl
P2 reverse (10 µM)	0,5 µl	GAA-R (10 µM)	0,5 µl
P3 forward (10 µM)	0,5 µl	GAA-F (10 µM)	0,5 µl
WT2 reverse (10 µM)	0,5 µl	Tampón reacción 10x (sin MgCl ₂)	2,5 µl
Tampón reacción 10x (sin MgCl ₂)	2,5 µl	DNA polimerasa Biotools (1 U/µl)	0,5 µl
DNA polimerasa Biotools (1U/ µl)	0,5 µl	H ₂ O c.s.p. 25 µl	18,5 µl
H ₂ O c.s.p. 25 µl	18 µl		

Tabla 5. Programas del termociclador utilizados en las PCR. A) amplificación múltiple del alelo normal y/o el alelo deleciónado de la frataxina murina. B) amplificación del transgén YG8. Los pasos de desnaturalización, anillamiento y elongación se repiten 35 veces en ambos programas.

	Fases	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Anillamiento	Elongación	Elongación final	Mantenimiento
A	Tª(°C)	96	94	60	72	72	4
	Tiempo	1'	30''	30''	1'	10'	Indefinido
B	Tª(°C)	95	94	60	72	72	4
	Tiempo	3'	30''	30''	2'	20'	indefinido

La determinación del número de copias del transgén YG8 se realizó por PCR a tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR), utilizando la tecnología Universal Probe Library de Roche. Como método de cuantificación se realizó una curva patrón, con concentraciones conocidas de 6,25, 12,5, 25 y 50 ng/μL, a partir del DNA genómico de un ratón YG8R con una sola copia en hemizigosis del transgén YG8. Las muestras de DNA genómico se analizan a distintas concentraciones de 10, 20 y 40 ng/μl y el número de copias del transgén YG8 que contienen se extrapola de la curva patrón. El sistema de PCR a tiempo real utilizado fue el 7900HT Fast Real Time PCR System, el programa de PCR el 7500 Fast (40 minutos) y el software el 7500 V2.0.4 (Applied Biosystems). Las **tablas 6 y 7** muestran los reactivos y el programa del termociclador, y la **tabla 8** las secuencias de los oligonucleótidos utilizados en las PCR y qPCR para realizar el genotipado de los ratones.

Tabla 6. Reactivos y volúmenes utilizados en la PCR a tiempo real para la amplificación y cuantificación del transgén YG8.

Componente	Volumen
DNA genómico patrón o muestras	1 μl
TaqMan Fast universal PCR Master Mix (2x),	10 μl
FRDA hum rev (10 μM)	0,4 μl
FRDA hum dir (10 μM)	0,4 μl
Sonda Taqman n°9 Roche	0,2 μl
H ₂ O c.s.p. 20 μl	8 μl

Tabla 7. La tabla muestra el programa del termociclador para la amplificación del transgén YG8 por PCR cuantitativa. El ciclo de desnaturalización a elongación se repite 40 veces.

Fases	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Elongación
Temperatura (°C)	95	95	60
Tiempo	20''	3''	30''

Tabla 8. Oligonucleótidos empleados. Se indica el nombre, la secuencia y la temperatura de anillamiento de los oligonucleótidos cebadores empleados en las diferentes reacciones de PCR y PCR a tiempo real descritas anteriormente.

Nombre	Especie	Secuencia 5'–3'	Tª anillamiento (°C)
P3 forward	Ratón	CTGTTTACCATGGCTGAGATCTC	63,7
WT 2 reverse	Ratón	TACCATGGCTGAGATCTCAGGC	67,1
P2 reverse	Ratón	CGCTCCCTACCCGGTAGAATTC	73,3
GAA-R	humano	GATCTAAGGACCATCATGGCCACACTTGCC	77,3
GAA-F	humano	GGGATTGGTTGCCAGTGCTTAAAAGTTAG	71,5
FRDA hum rev	humano	CTCAAGGTCCCGCACTTG	63,7
FRDA hum dir	humano	CCCCTGATTTGCTGTATGCT	63,9

4. Experimentos *in vivo*

4.1. Evaluación del peso corporal

El estudio del peso corporal de la colonia se realizó pesando todos los machos y hembras de los tres genotipos cada tres meses hasta su muerte. Los grupos de edad no están formados por los mismos individuos debido a diferentes razones: por sacrificio para experimentación, por presentar uno de los criterios de punto final o por muerte natural. Están excluidos todos los ratones, tanto machos como hembras, que estaban en acoplamiento en el momento del pesado. Las medias del peso corporal se compararon con la prueba estadística ANOVA multifactorial (edad*genotipo) y la significación en las diferencias de estas medias se determinó con la comparación a posteriori de Bonferroni.

4.2. Análisis de supervivencia

Una vez amplificada la colonia del modelo murino YG8R se dejó envejecer hasta la edad máxima de experimentación de 22-24 meses. El estudio de la supervivencia se realizó sobre todos los animales de la colonia, entre las edades de 1 a 22 meses, para evaluar la relación de las variables independientes genotipo y sexo con el evento “muerte natural” hasta la edad de experimentación. No debe considerarse como un estudio de la longevidad de los distintos genotipos y sexos. Todos aquellos casos que durante el tiempo del estudio, de 1 a 22 meses de edad, se sacrificaron por experimentación, por criterio de punto final o continuaron vivos al finalizar el tiempo del estudio se consideraron “casos censurados” [109, 110]. Los “casos censurados” antes de los 22 meses se eliminaron del análisis de supervivencia para no disminuir la probabilidad de supervivencia real y sólo calcular la probabilidad de sobrevivir en base a los que han muerto de forma natural [110, 111]. Una vez seleccionada la forma de analizar los datos se obtuvo un modelo de datos con censura tipo I a la derecha. El modelo de censura tipo I significa que se ha fijado una edad concreta para la finalización del estudio y no hay casos perdidos durante el estudio, porque los hemos eliminado. El modelo de censura a la derecha significa que la mayor parte de los casos aparecen censurados después de finalizar el estudio (**Figura 18**). El objetivo del análisis de supervivencia fue estimar e interpretar las curvas de supervivencia, comparar curvas de supervivencia entre dos o más grupos (genotipo*sexo) y evaluar la relación de la supervivencia con más de una variable pronóstico hasta la edad de experimentación del modelo.

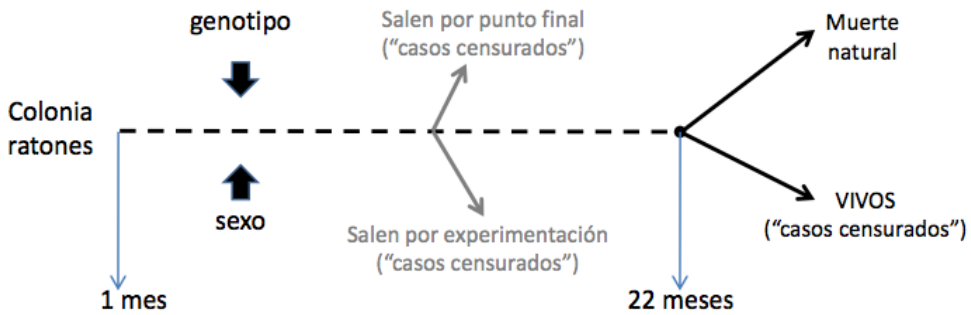


Figura 18. Representación del modelo de datos de censura tipo I a la derecha en el análisis de supervivencia.

El análisis estudió la influencia de dos factores independientes categóricos, como son el genotipo y el sexo, sobre dos factores dependientes, uno dicotómico que es el estado al finalizar el estudio (muerte natural/caso censurado) y el otro cuantitativo que es la edad a la que aparece el evento muerte natural. En gris los “casos censurados” durante el tiempo de estudio, de 1 a 22 meses, que se han eliminado del análisis porque no son pérdidas por muerte natural.

4.2.1. Curvas de supervivencia

El análisis de la supervivencia se realizó con el método no paramétrico de Kaplan-Meier, indicado en estudios con observaciones incompletas por casos censurados, para conocer la distribución del tiempo de espera hasta la aparición del evento muerte natural. El método de Kaplan-Meier calculó la probabilidad de supervivencia acumulada en cada uno de los intervalos definidos por la aparición del evento muerte natural y generó las curvas de supervivencia entre los grupos definidos por la variable genotipo y estratificados por la variable sexo. La diferencia entre las curvas de supervivencia se analizó con el estadístico de Log-Rank (Mantel-Cox), indicado en censura tipo I cuando el riesgo es proporcional, que tiene en cuenta las diferencias de supervivencia entre los grupos en todos los puntos que dura el seguimiento [112].

4.2.2. Regresión de Cox

El análisis multifactorial de las variables identificadas como posibles factores de riesgo de la supervivencia se realizó con el método no paramétrico de riesgos proporcionales de Cox, indicado en estudios con observaciones incompletas por casos censurados. Es una regresión logística que calcula el riesgo relativo o riesgo pronóstico con el que cada una de las variables determina la aparición del evento muerte natural y las interacciones entre ellas para establecer la jerarquía entre los distintos factores pronóstico. Primero se realizó un análisis univariante para conocer la significación de cada una de las variables predictorias individualmente en la supervivencia, no ajustadas por las restantes variables. Las variables categóricas (genotipo y sexo) fueron transformada en variables “dummy” o “ficticias” con nivel de referencia primero (C57BL/6J y macho, respectivamente) y la variable cuantitativa peso corporal se analizó por regresión de Cox con covariables dependientes del tiempo. Después se realizó un análisis multivariante hacia adelante (“forward”), en el

que se estudian todas las variables, el modelo final sólo incluye las variables significativas y determina la mejor combinación de factores independientes pronóstico de supervivencia. El nivel de significación estadística (riesgo alfa) asumido durante todo el estudio fue del 5% [109, 110, 113, 114].

4.3. Evaluación de la función locomotora

4.3.1. Prueba del rotarod

La prueba del Rotarod consiste en medir el tiempo de latencia que tarda en caer un ratón desde un eje en rotación, comenzando a 4 rpm y acelerando hasta un máximo de 40 rpm durante cinco minutos (UgoBasile) (**Figura 19**). Los grupos de experimentación pasaron una prueba de rotarod mensual, desde los 3 hasta los 9 meses de edad. Una semana antes de la prueba inicial se realizó un aprendizaje durante cuatro días consecutivos. Los dos primeros días el ratón debía mantenerse sin caer durante 60 segundos a la velocidad fija de 4 rpm y los dos días siguientes debía mantenerse sin caer más de 60 segundos aumentando la velocidad de 4 a 40 r.p.m. 24 horas antes de cada prueba mensual se realizó un entrenamiento recordatorio que consistía en dos repeticiones de la prueba separados por 10 minutos de descanso ITI (intervalo de tiempo interexperimental). Finalmente, la prueba consistía en 4 repeticiones cada una separada por 10 minutos de descanso ITI, durante 4 días consecutivos [115-117]. Las medias del tiempo de latencia en caer se compararon con la prueba estadística ANOVA multifactorial (edad x genotipo) y la significación en las diferencias de las medias se determinó con la comparación a posteriori de Bonferroni.

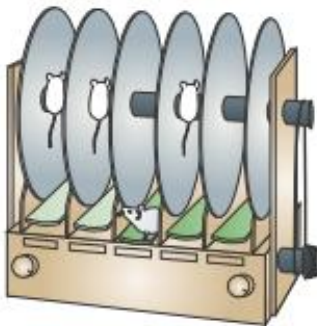


Figura 19. Ilustración esquemática de un aparato rotarod estándar para testar la coordinación motora.

El Rotarod es una barra que puede rotar a una velocidad fija o en aceleración. El ratón debe permanecer en la barra y su latencia en caer provee una medida de su coordinación motora. Adaptado de Brooks y Dunnett (2009) [115].

4.3.2. Prueba de la barra de equilibrio

La prueba de la barra de equilibrio consiste en medir el tiempo que tardan los ratones en atravesar una barra de madera plana de 1 metro de largo con anchos de 26, 12 y 5 mm. Las barras se disponen horizontalmente, a una altura de 50 cm del suelo, con una caja cuadrada de 20 cm cerrada al final en la que el ratón pueda entrar a modo de escape (**Figura 20**). Los grupos de experimentación pasaron una prueba de la barra de

equilibrio mensual, desde los 10 hasta los 15 meses de edad. Una semana antes de la prueba inicial se realizó un aprendizaje, en el que el ratón debía atravesar las barras de 26 y 12 mm de ancho en menos de 20 segundos tres veces consecutivas. 48 horas antes de cada prueba mensual se realizó un entrenamiento recordatorio que consistía en una prueba de la barra completa. Finalmente, la prueba consistía en hacer pasar a cada ratón por cada barra (26, 12 y 5 mm) tres veces consecutivas, separadas por 10 minutos de descanso ITI entre cada barra. El tiempo máximo para atravesar cada barra es de 60 segundos [115, 116, 118, 119]. Las medias del tiempo de atravesar se compararon con la prueba estadística ANOVA multifactorial (edad x genotipo x ancho de barra) y la significación en la diferencias de las medias se determinó con la comparación a posteriori de Bonferroni.

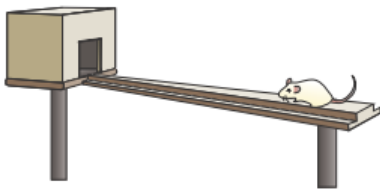


Figura 20. Ilustración esquemática de un montaje de la barra de equilibrio para testar la coordinación motora.

El ratón se dispone en la barra y su habilidad para atravesarla se considera un indicador de su equilibrio. Adaptado de Brooks y Dunnett (2009) [115].

4.3.3. Prueba del palo

La prueba del palo consiste en colocar al ratón con la cabeza hacia arriba en lo alto de un palo de madera rugoso, de 8 mm de diámetro y 55 cm de alto, dispuesto verticalmente, y medir el tiempo que el ratón tarda en darse la vuelta y descender hasta la base (**Figura 21**). Los grupos de experimentación pasaron una prueba del palo mensual, desde los 10 hasta los 15 meses de edad. Una semana antes de la prueba inicial se realizó un aprendizaje, en el que el ratón debía girarse y descender en menos de 120 segundos cinco veces consecutivas. 48 horas antes de cada prueba mensual se realizó un entrenamiento recordatorio que consistía en una prueba del palo completo. Finalmente, la prueba consistía en hacer girar y descender a cada ratón cinco veces consecutivas, sin descanso entre las repeticiones. El tiempo máximo para girar y descender es de 120 segundos. Si un ratón no llega a girar y se queda en lo alto del palo sin descender se le contabiliza el tiempo máximo de actividad locomotora de 120 segundos [120, 121]. Las medias del tiempo en darse la vuelta, el tiempo en descender y el tiempo de actividad locomotora total se compararon con la prueba estadística ANOVA multifactorial (edad*genotipo) y la significación en la diferencias de las medias se determinó con la comparación a posteriori de Bonferroni. La comparación de las proporciones o porcentaje de animales que se quedan en lo alto del palo y de animales que se giran y descienden hasta la base entre los genotipos se analizó con una tabla de contingencia 2x2 para cada una de las edades por separado, y la significación entre las frecuencias obtenidas se determinó con el estadístico exacto de Fisher.



Figura 21. Imagen que representa las partes de la prueba del palo. La imagen de la derecha muestra la primera parte de la prueba en la que el ratón debe orientarse y girarse sobre sí mismo para ponerse bocabajo. La imagen de la izquierda muestra la segunda parte de la prueba que consiste en descender hasta la base del palo, <http://www.qps-austria.com>.

5. Análisis de proteínas

5.1. Inmunodetección de la expresión de proteínas por *western blot*

El extracto proteico total se realizó lisando la muestra con un volumen adecuado de tampón de lisis (TrisHCl pH 7.4 50 mM, Triton X-100 1%, MgCl₂ 1,5 mM, NaF 50 mM, EDTA 5 mM, Na₃VO₄ 1 mM, PMSF 0,1 mM, DTT 1 mM y cóctel inhibidor de proteasas 1x de Roche) mediante homogeneizador de vidrio o politrón a 4°C. Para las muestras de ganglios dorsales y raíces espinales se añadió un proceso de sonicación durante 15 segundos. El homogenado se centrifugó a 13.000 g durante 10 minutos a 4°C y los sobrenadantes se recogieron y se almacenaron a -80°C hasta su uso. La concentración de proteína se determinó por el método Bradford (Biorad). De 10 a 30 µg de proteína se añadieron al tampón de carga desnaturante (SDS 10%), se hirvieron durante 5 minutos y se separaron por electroforesis desnaturante en geles al 12% de poliácridamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE). Las proteínas se sometieron a electrotransferencia (Bio-Rad) para transferirlas a una membrana de PVDF (GE Healthcare Life Sciences). La posición de las bandas de proteína fue estimada usando el marcador de peso molecular pre-teñido See Blue (Invitrogen) y la eficiencia de la transferencia se reveló por tinción de la membrana con Ponceau S. Las membranas se bloquearon con leche desnatada 0,05 g/ml en TBS-T (tampón salino tris con detergente tween-20 al 0,1%), se lavaron tres veces y se incubaron con anticuerpos primarios durante toda la noche a 4°C (ver **Tabla 1**). Las membranas se lavaron tres veces con TBS-T y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado HRP adecuado (ver **Tabla 2**). El revelado de las membranas se realizó por quimioluminiscencia con ECL Prime (GE Healthcare Life Sciences) y cámara CCD LAS 3000 (Fujifilm). La densitometría se midió utilizando el software V2.1 Gauge (Fujifilm). La inmunodetección de las proteínas carboniladas se realizó sobre los extractos proteicos totales de las muestras biológicas murinas con el kit Oxyblot (Millipore), según las instrucciones del fabricante. Cada una de las proteínas cuantificadas por inmunodetección consta al menos de tres réplicas experimentales biológicas (ratones N=3), y dos réplicas técnicas (repetidas por duplicado en días distintos). La densitometría de las proteínas detectadas se normalizó con la densitometría de la actina correspondiente y se calculó el porcentaje de expresión de la proteína con respecto al control C57BL/6J, incluido en cada una de

las membranas analizadas. Las medias de los porcentajes de expresión de cada proteína se compararon con la prueba estadística ANOVA de un factor (genotipo) y la significación en la diferencias de las medias se determinó con la comparación a posteriori de Bonferroni.

5.2. Inmunocitoquímica de la expresión de proteínas por inmunofluorescencia indirecta

La tinción mitocondrial se realizó con la sonda Mito Tracker Deep Red 633 durante 15 minutos a 37°C en el incubador celular, seguido de un lavado con medio definido durante 15 minutos más a 37°C en el incubador celular. El mitotracker deep red es una sonda selectiva de mitocondria basada en carbociano que localiza la mitocondria funcional activamente. Una vez teñida la mitocondria el cultivo neuronal se fija y bloquea y se puede combinar con IFI para inmunodetección. La fijación del cultivo neuronal se realizó con para-formaldehido (PFA) al 4% y sacarosa 120 mM en tampón fosfato 0,1 M (PB 0,1 M) durante 20 minutos a temperatura ambiente, seguido de tres lavados con PB 0,1 M. El bloqueo del cultivo neuronal se realizó con suero fetal bovino (FBS) al 10% y Triton X-100 al 0,2% en PB 0,1 M durante 30 minutos a temperatura ambiente (tampón de bloqueo). La incubación de los anticuerpos primarios se realizó durante toda la noche a 4°C en tampón de bloqueo a la dilución correspondiente (ver **Tabla 1**), y después de tres lavados con PB 0,1 M se incubaron con los anticuerpos secundarios fluorescentes correspondientes (ver **Tabla 2**), durante 45 minutos a temperatura ambiente en tampón de bloqueo. Después de tres lavados con PB 0,1 M se realizó la tinción nuclear con DAPI durante 15 minutos a temperatura ambiente. Los cubres del cultivo neuronal se montaron con Fluoromount G (Southern Biotech Assoc. Inc., Birmingham, AL, EE.UU).

6. Estudio del perfil proteómico por 2D-DIGE

Los cambios en el patrón de expresión de proteínas entre el ganglio dorsal del ratón deficiente en frataxina YG8R y el control C57BL/6J, a los 24 meses de edad, se evaluó mediante proteómica basada en la tecnología de electroforesis bidimensional 2D-DIGE (Bidimensional *Differential In Gel Electrophoresis*) y realizada en la Unidad de Proteómica (Electroforesis Bidimensional) de la Unidad Central de Investigación (UCIM)- Servei Central de Suport a la Investigació Experimental (S.C.S.I.E) de la Universitat de València. Los *spots* que aparecieron diferentes entre el YG8R y el control C57BL/6J, con una variación mayor de 1.3, se picaron, se digirieron con tripsina y se analizaron por MALDI-TOF-TOF (4700 Proteomics Analyzer, ABSciex) o por Líquido Masas, LC-MS/MS, (5600 tripleTOF, ABSciex). El análisis del perfil proteómico se realizó en los Servicios de proteómica del Centro de Investigación Príncipe Felipe (Valencia) y del Servei Central de Suport a la Investigació Experimental (S.C.S.I.E) de la Universitat de València. Para obtener un listado de los péptidos analizados con sus

parámetros característicos se utilizó el software ProteinPilot (ABSciex). Para identificar las secuencias peptídicas se utilizó la base de datos de proteínas ExPasy, mediante el motor de búsqueda Paragon algorithm del ProteinPilot. Sólo las proteínas del grupo para las que hay evidencias individuales (péptidos únicos con suficiente confianza) han sido listadas. El porcentaje de confianza se expresa en unidades Unused Prot Score, de forma que: un 99% de confianza corresponde a una puntuación ProtScore de 2.0, un 95% de confianza corresponde a una puntuación ProtScore de 1.3 y un 90% de confianza corresponde a una puntuación ProtScore de 1.0. La puntuación Unused Prot Score es un parámetro que determina la contribución hecha por un único péptido ID al total del ProtScore y es una medida de la confianza con la que se ha identificado la proteína. El estudio consta de tres réplicas experimentales biológicas (ratones N=3).

7. Análisis de la expresión génica en neuronas sensitivas

7.1. Aislamiento de las neuronas propioceptivas del ganglio dorsal

Para el aislamiento de las neuronas propioceptivas del resto de poblaciones neuronales del ganglio dorsal se utilizó el sistema comercial Dynabeads Flow Comp Flexy (Invitrogen) basado en la interacción biotina-estreptavidina [122]. El esquema de los pasos realizados en el aislamiento se representa en la **Figura 22**.

En el 1º paso los anticuerpos anti-TrkC y anti-parvalbúmina, que detectan proteínas específicas de las neuronas propioceptivas, se biotinilaron con DSB-X™ Biotin Protein Labeling Kit (Invitrogen, Molecular Probes). En el 2º - 3º paso los anticuerpos biotinilados se incubaron con una muestra de ganglio dorsal disgregado enzimáticamente. A continuación, en el paso 4º - 5º, se incubaron con unas bolas magnéticas unidas a estreptavidina que se separaron magnéticamente con DynaMag™-15 (Invitrogen, Molecular Probes). En el último paso se separaron las bolas magnéticas con el tampón de liberación que compite por la unión a la estreptavidina y desplaza a los anticuerpos marcados con biotina DSB-x, liberando así la población propioceptiva aislada (Prop) de la población no propioceptiva (NoP).

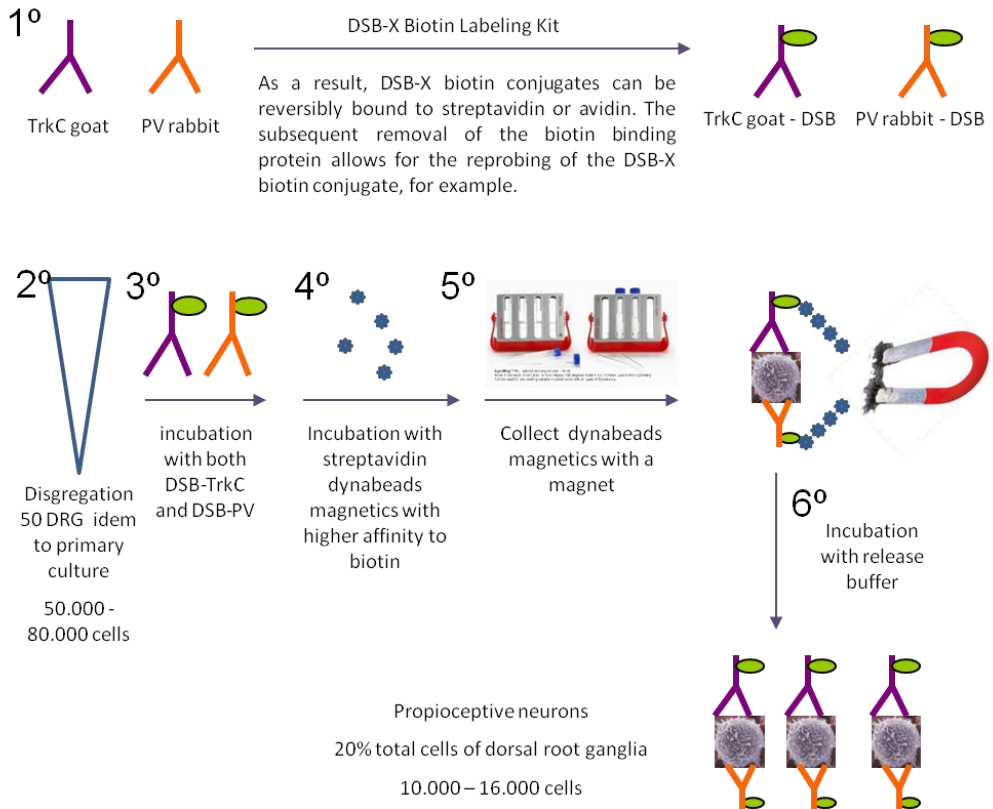


Figura 22. Esquema de la estrategia para el aislamiento de las neuronas propioceptivas del resto de neuronas sensitivas del ganglio dorsal.

7.2. Aislamiento de RNA, RT-PCR y PCR Array

La determinación y análisis de los perfiles de expresión génica en la población propioceptiva del ganglio dorsal se realizó con un array específico de receptores de neurotrofinas y reguladores. Una vez aisladas las dos fracciones Prop y NoP, según el apartado 7.1 de material y métodos, se realizó la extracción del RNA con "RNeasy micro kit" de Qiagen, específico para muestras $\leq 5 \times 10^5$ células. La pureza y calidad del RNA extraído se analizó por medida de la densidad óptica a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro (NanoDrop ND-100 Spectrophotometer, NanoDrop Technologies). La distribución de la integridad y el tamaño de RNA total purificado se comprobaron mediante electroforesis en gel desnaturalizante de agarosa y tinción con bromuro de etidio. En segundo lugar se procedió a la síntesis y pre-amplificación de la primera hebra de cDNA utilizando "RT2 Nano PreAMP cDNA Synthesis Kit", específico para muestras de pequeño tamaño. Y en tercer lugar se realizó una q-PCR a tiempo real (7500 Fast Real-Time PCR system, Applied Biosystems) utilizando la tecnología RT2 Profiler de SABiosciences. En el array seleccionado (Mouse neurotransmitter

receptors and regulators) están representadas moléculas de señalización neurotrófica incluyendo neurotrofinas y neuropéptidos así como sus receptores. También contiene genes relacionados con las funciones normales del sistema neuronal incluyendo crecimiento, diferenciación neuronal, regeneración y supervivencia. Las citoquinas y receptores relacionados en la señalización neuronal también están presentes en el array, como genes involucrados en la transmisión del impulso nervioso. Por último hay genes relacionados con la apoptosis neuronal en respuesta a factores neurotróficos y factores de transcripción y reguladores indicativos de la activación de rutas posteriores del sistema neuronal.

8. Experimentos *in vitro*: ensayos celulares

Los cultivos primarios de neuronas sensitivas fueron expuestos a distintos compuestos en determinadas condiciones de tiempo y concentración, indicados en cada uno de los experimentos. En todos los tratamientos las concentraciones de los vehículos, DMSO (Sigma-Aldrich) y etanol (Scharlab), fueron inferiores a 0,01%. Por lo que no se realizó el tratamiento control con el vehículo, en el que fue disuelto cada compuesto, para descartar efectos inespecíficos.

8.1. Determinación de la función mitocondrial: potencial de membrana mitocondrial

El estudio del $\Delta\psi_m$ se realizó con la sonda JC-1 (Molecular Probes™). El JC-1 es una sonda que rápidamente se dirige a la mitocondria, allí se agrega y emite fluorescencia naranja-roja a 590 nm cuando el $\Delta\psi_m$ es alto. Se queda en forma de monómero y emite fluorescencia verde a 530 nm cuando el $\Delta\psi_m$ es bajo. Los resultados se expresan en ratio de fluorescencia 590 nm/530 nm, que depende del $\Delta\psi_m$, de forma que una despolarización mitocondrial implica el aumento de la fluorescencia verde a 530 nm y la disminución del ratio de fluorescencia. Las neuronas sensitivas de un cultivo primario de 5 *div* se incubaron con 3 μ M de JC-1 durante 30 minutos a 37°C en el incubador celular, seguido de una fijación muy suave con PFA 0,5% y sacarosa 120 mM en PB 0,1 M durante 10 minutos a temperatura ambiente. Como control positivo de despolarización mitocondrial se trató el control C57BL/6J con 4 μ M CCCP + 1 μ M oligomicina (Sigma-Aldrich), durante 10 minutos previamente a la tinción con JC-1 y durante los 30 minutos de la incubación de la sonda. La fluorescencia de la sonda JC-1 se recogió mediante microscopía confocal seleccionando los rangos de emisión naranja-roja (585-630 nm) y verde (510-550 nm). Se utilizó un objetivo 63x de aceite. Cada uno de los grupos de experimentación consta al menos de tres réplicas experimentales biológicas (ratones N=3) y dos réplicas técnicas de cada muestra biológica. Las medias de la fluorescencia se compararon con la prueba estadística ANOVA de un factor (genotipo) y la significación en la diferencias de las medias entre los grupos se determinó con la comparación a posteriori de Bonferroni.

8.2. Determinación de los niveles de estrés oxidativo: producción de anión superóxido intracelular

El estudio de los niveles de la producción de $O_2^{\bullet-}$ se realizó con la sonda MitoSOX™ (Molecular Probes™). El MitoSOX es una sonda que rápidamente se dirige a la mitocondria, allí se oxida con el $O_2^{\bullet-}$ y emite a fluorescencia 580 nm. Las neuronas sensitivas de un cultivo primario de 5 *div* se incubaron con 3 μ M de MitoSOX durante 30 minutos a 37°C en el incubador celular, seguido de una fijación con p-formaldehído 4% y sacarosa 120 mM en PB 0,1 M durante 10 minutos a temperatura ambiente. Como control positivo de producción de $O_2^{\bullet-}$ se trató el control C57BL/6J con H_2O_2 500 μ M durante 30 minutos previo a la tinción con MitoSOX y durante los 30 minutos de la incubación de la sonda. Como control positivo de despolarización mitocondrial se trató el control C57BL/6J con 4 μ M CCCP + 1 μ M oligomicina durante 30 minutos previamente a la tinción con MitoSOX y durante los 30 minutos de la incubación de la sonda. Para recoger la fluorescencia del MitoSOX se utilizó microscopía vertical con el filtro N2.1 (BP 515-560) y objetivo 40x sin aceite. Cada uno de los grupos de experimentación consta al menos de tres réplicas experimentales biológicas (ratones N=3) y dos réplicas técnicas de cada muestra biológica. Las medias de la fluorescencia se compararon con la prueba estadística ANOVA de un factor (genotipo) y la significación en la diferencias de las medias entre los grupos se determinó con la comparación a posteriori de Bonferroni.

8.3. Estudio de la homeostasis del calcio *in vivo*: niveles de calcio citosólicos

El estudio de los niveles del Ca^{2+} citosólico se realizó con la sonda Fura-2 AM (Molecular Probes™). El Fura-2 AM es un indicador de calcio de tipo radiométrico que se excita alternativamente a 340 nm (λ de excitación de la sonda Fura-2 AM unida a Ca^{2+}) y 380 nm (λ de excitación de la sonda libre) y en ambos casos emite a 510 nm. Los resultados se expresan en ratio de fluorescencia de excitación de 340 nm/380 nm, que depende de los niveles del Ca^{2+} citosólico, de forma que un aumento del Ca^{2+} citosólico aumenta la fluorescencia cuando se excita a 340 nm y aumenta el ratio 340 nm / 380 nm.

Las neuronas sensitivas de un cultivo primario de 5 *div* se incubaron con Fura-2 AM 5 μ M y ácido plurónico 0,06% (Sigma-Aldrich), en tampón de carga (NaCl 120 mM, $MgCl_2$ 0,8 mM, HEPES 25 mM, KCl 5,4 mM, glucosa 30 mM, pH 7.0) durante 30 minutos a 37°C en el incubador celular, seguido de una incubación con tampón con Ca^{2+} (NaCl 120 mM, $MgCl_2$ 0,8 mM, HEPES 25 mM, KCl 5,4 mM, Glucosa 30 mM, $CaCl_2$ 2 mM, pH 7.0) durante 30 minutos a 37°C en el incubador celular. Tras la carga de las neuronas con Ca^{2+} , se realizaron 3 lavados rápidos con tampón de lavado sin Ca^{2+} (NaCl 120 mM, $MgCl_2$ 0,8 mM, HEPES 25 mM, KCl 5,4 mM, Glucosa 30 mM, EGTA 1 mM, pH 7) y se llevaron al microscopio.

Para el estudio del manejo del Ca^{2+} intracelular, de las neuronas sensitivas *in vivo*, se indujo la depleción de los depósitos de Ca^{2+} del RE con 150 μ M de tBuBHQ. El tBuBHQ (Alomone Labs) es un inhibidor de la bomba SERCA del RE, que aumenta los niveles de Ca^{2+} citosólicos e induce el mecanismo SOCE para el relleno de Ca^{2+} del

RE. A los cinco minutos tras la adición del tBuBHQ, se añadió una sobrecarga de Ca^{2+} al medio extracelular (6 mM CaCl_2) que rápidamente entra a la neurona, si el mecanismo del SOCE funciona correctamente, y aumenta los niveles de Ca^{2+} citosólico. Como control positivo de despolarización mitocondrial se trató el control C57BL/6J con 4 μM CCCP + 1 μM oligomicina durante 10 minutos previamente a la inducción con tBuBHQ y durante los 10 minutos que dura el ensayo del manejo del Ca^{2+} intracelular. Para convertir la señal fluorescente radiométrica de la sonda Fura-2 AM en concentración de calcio intracelular libre, $[\text{Ca}^{2+}]_i$, se obtuvo la fluorescencia máxima (Rmax) del Fura-2 AM con 5 μM del ionóforo Br-A23187 (Sigma-Aldrich) en tampón con Ca^{2+} y la fluorescencia mínima (Rmin) con 4 mM de EGTA (Scharlab) en tampón sin Ca^{2+} y se aplicó la ecuación de Grynkiewicz, en cultivo neuronal *in vivo* de 5 div.

Para recoger la fluorescencia del Fura-2 AM se utilizó microscopía vertical con control de temperatura a 37°C, para mantener el cultivo neuronal *in vivo*, con objetivo 40x de aceite. La señal fluorescente se monitorizó y analizó con el software de Leica MM Fluor. Cada uno de los grupos de experimentación consta al menos de tres réplicas experimentales biológicas (ratones N=3) y 3 réplicas técnicas de cada muestra biológica. Las medias de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal y los AUC se compararon con la prueba estadística ANOVA de un factor (genotipo) y la significación en la diferencias de las medias entre los grupos se determinó con la comparación a posteriori de Bonferroni.

8.4. Determinación de la actividad calpaína *in vivo*

La medida de la actividad calpaína se realizó con la sonda CMAC, t-BOC-Leu-Met (Molecular Probes™). El 7-amino-4-chloromethylcoumarin o t-BOC-L-leucyl-L-methionine amide (CMAC, t-BOC-Leu-Met) es un sustrato tipo peptidasa específico para calpaína, es permeable a la célula y una vez en el citosol la calpaína lo corta. t-BOC es el producto del corte proteolítico y emite fluorescencia azul a 430 nm de forma proporcional a la actividad calpaína.

Las neuronas sensitivas de un cultivo primario de 3 div se incubaron con la sonda Mitotracker deep red a 200 nM durante 15 minutos a 37°C, después se retiró esta tinción y se incubaron con 10 μM t-BOC en medio definido durante 15 minutos a 37°C en el incubador celular. La recogida de la fluorescencia a 430 nm, correspondiente al t-BOC, y a 630 nm, correspondiente al mitotracker, por microscopia confocal en cultivo neuronal *in vivo* se realizó a 37°C y 5% de CO_2 con objetivo 40x de aceite. Para estudiar si la actividad calpaína era dependiente de los niveles de Ca^{2+} citosólicos las neuronas sensitivas de un cultivo primario de 2 div se trataron durante 24 horas con: i) 1 mM EGTA (Sigma-Aldrich), quelante del calcio extracelular; ii) 20 μM BAPTA-AM (Molecular Probes), quelante del calcio intracelular; iii) 100 μM O-fenantrolina, inhibidor de metaloproteasas y quelante de Fe^{2+} , (cedida por el Dr. Erwin Knecht, del Centro de Investigación Príncipe Felipe en Valencia); iv) 3,6 mM CaCl_2 , aumentando así la cantidad de calcio extracelular al doble de la concentración fisiológica de 1,8 mM. Todas estas condiciones se compararon con la condición basal. Cada uno de los grupos de experimentación consta al menos de tres réplicas experimentales

biológicas (ratones N=3). Las medias de la fluorescencia se compararon con la prueba estadística ANOVA multifactorial (genotipo x tratamiento) y la significación en la diferencias de las medias entre los grupos se determinó con la comparación a posteriori de Bonferroni.

8.5. Determinación de la actividad de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) *in vivo*

El estudio de los niveles del Ca^{2+} citosólico se realizó con la sonda Fluo-8 AM (Abcam). El Fluo-8 AM se utilizó para medir los cambios en el Ca^{2+} citosólico debidos a la activación de los receptores acoplados a proteína G (GPCR). El Fluo-8AM es un indicador de calcio de tipo fluorimétrico. Es un quelante de Ca^{2+} unido a un fluorocromo, que se excita a 490 nm y emite a 525 nm. Los resultados se expresan en intensidad de fluorescencia, que depende de los niveles del Ca^{2+} citosólico, de forma que un aumento del Ca^{2+} citosólico aumenta la fluorescencia del Fluo-8 AM.

Las neuronas sensitivas de un cultivo primario de 5 *div* se incubaron al mismo tiempo con 200 nM de Mitotracker deep red, 5 μM de Fluo-8 AM y 0,06% de ácido plurónico, en tampón Hank con 20 mM HEPES a pH 7.0 (HHBS) durante 45 minutos a 37°C en el incubador celular. Después se llevaron al microscopio confocal en tampón HHBS. La recogida de la fluorescencia a 525 nm, correspondiente al Fluo-8 AM, y a 630 nm, correspondiente al mitotracker, por microscopia confocal en cultivo neuronal *in vivo* se realizó a 37°C y 5% de CO_2 con objetivo 40x de aceite. Para estudiar si los niveles de calcio citosólicos eran dependientes de la señalización por GPCR las neuronas sensitivas se trataron desde el momento de la siembra y durante 5 *div* con: i) 13,5 μM nicardipino (Sigma-Aldrich), ii) 300 nM silfenafilo (Sigma-Aldrich); iii) 0,5 μM rolipram (Sigma-Aldrich) y se comparó con la condición basal. Cada uno de los grupos de experimentación consta al menos de tres réplicas experimentales (ratones N=3). Las medias de los ratios de fluorescencia se compararon con la prueba estadística ANOVA multifactorial (genotipo x tratamiento) y la significación en la diferencias de las medias entre los grupos se determinó con la comparación a posteriori de Bonferroni.

9. Análisis morfométrico

9.1. Determinación de parámetros morfológicos neuronales y distribución neuronal

El análisis morfométrico de las neuronas sensitivas del cultivo primario de 3 y 5 *div* consistió en la medición del área (μm^2) y del diámetro de Feret (μm) de los somas neuronales con el programa ImageJ. La recogida de la imagen se realizó en campo claro con microscopia confocal en cultivo neuronal *in vivo* a 37°C y 5% de CO_2 con objetivo 40x de aceite. Cada uno de los grupos de experimentación consta al menos de tres réplicas experimentales biológicas (ratones N=3). La comparación de la distribución de la frecuencia acumulada de las áreas y los diámetros entre los genotipos se analizó dos a dos usando el test de comparación de dos muestras de Kolmogorov-Smirnoff [123]. La comparación de las proporciones o la frecuencia de distribución de las áreas y los diámetros en 3 rangos de tamaño entre los genotipos se

analizó con una tabla de contingencia (3x2) para cada uno de los genotipos deficientes en frataxina respecto al control por separado, y la significación entre las frecuencias obtenidas se determinó con el estadístico exacto de Fisher. Las medias del área y del diámetro de Feret se compararon con la prueba estadística ANOVA multifactorial (genotipo) y la significación en la diferencias de las medias entre los grupos se determinó con la comparación a posteriori de Bonferroni.





9.2. Determinación de parámetros morfológicos mitocondriales y distribución mitocondrial

El análisis de la distribución y la morfología mitocondrial de las neuronas sensitivas se realizó marcando la mitocondria con la sonda Mitotracker Deep red, e identificando la población neuronal, mediante IFI, con β -tubulinaIII.

El estudio de la morfología mitocondrial se realizó en tres experimentos distintos: 1) En neuronas sensitivas de 5 *div* en condiciones basales de cultivo. Como control positivo de despolarización mitocondrial se trató el control C57BL/6J con 4 μ M CCCP + 1 μ M oligomicina. Como control positivo de elevados niveles de Ca^{2+} citosólicos se trató el control C57BL/6J con el ionóforo Br-A23187 5 μ M. Ambos controles se trataron durante 30 minutos previamente a la tinción y durante la tinción con mitotracker deep red; 2) En neuronas sensitivas de 4 *div* en condiciones basales de cultivo y tratadas, desde el momento de la siembra, con EGTA, BAPTA y o-fenantrolina, como en el apartado 8.4 de material y métodos; 3) En neuronas sensitivas de 5 *div* en condiciones basales de cultivo y tratadas, desde el momento de la siembra, con nicardipino, silfenafilo y rolipram, como en el apartado 8.5 de material y métodos.







Cada uno de los grupos de experimentación consta al menos de tres réplicas experimentales biológicas (ratones N=3). La recogida de la fluorescencia a 525 nm, correspondiente a la β -tubulinaIII, y a 630 nm, correspondiente al mitotracker, se realizó por microscopía confocal con objetivo 40x de aceite.



El análisis de la morfología mitocondrial se realizó con el software de imagen ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>). Y se aplicó el macro “*mito-morphology*” diseñado por Ruben K. Dadga y colaboradores [124].

Se analizaron los parámetros de número de mitocondrias como objetos presentes en la imagen, % de área celular que ocupan, el índice de elongación, el índice de interconectividad y el índice de hinchazón mitocondrial (**Tabla 9**). El índice de elongación es la inversa de la circularidad de los objetivos e indica si la mitocondria tiene forma elongada normal [] o por el contrario está redondeada []. El índice de interconectividad es el ratio entre el área/perímetro de los objetos e indica si las mitocondrias están normales [] o por el contrario están interconectadas entre sí formando una única gran masa reticular []. El índice de hinchazón es el ratio entre el área/perímetro normalizado por la circularidad, de esta forma se puede diferenciar del índice de interconectividad. Cuando la mitocondria se hincha su forma cambia de filamentosa a esférica y su diámetro aumenta (**Figura 23**). Este cambio morfológico es

debido a que el ratio del perímetro/volumen es mayor en las formas esféricas que en las formas elongadas.

Tabla 9. Parámetros morfológicos mitocondriales analizados mediante microscopía de fluorescencia.

Parámetro	Descripción	Fórmula	Significación
Número de mitocondrias	Objetos presentes en la imagen		
% de área celular que ocupan las mitocondrias	Mide la masa mitocondrial	$\%ocup = \frac{\text{área mitoc}}{\text{área axonal}} \times 100$	Superficie del axón que ocupa la masa mitocondrial
Circularidad	Mide la morfología o forma de las mitocondrias	$Circ = 4\pi \times \left(\frac{\text{área}}{\text{perímetro}^2} \right)$	Indica la esfericidad de la mitocondria. Circularidades de 1 indican esferoides perfectos y circularidades de 0 indican mitocondrias muy elongadas
Índice de elongación	Mide la morfología de las mitocondrias	$Elong = \frac{1}{\text{circularidad}}$	Indica si la mitocondria tiene forma elongada o alargada normal [] o por el contrario está redondeada []. Elongaciones de 1 indican cilindro perfecto y elongaciones de 0 indican esferoides perfectos
Índice de interconectividad	Mide el tamaño de las mitocondrias	$Interconectiv = \frac{\text{área}}{\text{perímetro}}$	Indica si las mitocondrias están normales [] o por el contrario están interconectadas entre sí formando una única gran masa reticular []
Índice de hinchazón mitocondrial	Mide el tamaño teniendo en cuenta la morfología de las mitocondrias	$Hinchazón = \frac{\left(\frac{\text{área}}{\text{perímetro}} \right)}{\text{circularidad}}$	Indica si la mitocondria tiene más tamaño porque está hinchada y redonda [] o por el contrario porque está más interconectada []

Condition of mitochondria	No swelling	Swelling without stretching the surface
Morphology		
Surface area	S_1	$S_2 = S_1$
Volume	V_1	$V_2 = 1.72V_1$
Diameter	d_1	$d_2 = 2.34d_1$

C

Figura 23. Cambios en la morfología mitocondrial cuando se hincha sin cambios en la superficie o área mitocondrial.

Bajo condiciones normales la mitocondria aparece como estructuras filamentosas. Después de hincharse la mitocondria cambia a formas esféricas. El área de la mitocondria es la misma, pero el diámetro aumenta y el volumen aumenta. Se muestran los cambios calculados en el volumen y diámetro cuando una mitocondria se hincha, sin cambiar la superficie. El ratio longitud/diámetro fue asumida 5 veces más antes del hinchazón. Adaptado de Gao y colaboradores (2001) [125].

10. Microscopía

10.1. Microscopía electrónica

Las imágenes de microscopía electrónica se realizaron en el Servicio de Microscopía del Centro de Investigación Príncipe Felipe (Valencia). Las neuronas sensitivas se sembraron en cámaras de permanox (Nunc) pretratadas con ornitina y laminina conforme protocolo habitual y se cultivaron durante 5 *div*, entonces se fijaron sucesivamente con glutaraldehído 2,5% (v/v) en PB 0,1 M pH 7.4 durante 5 minutos a 37°C y durante 1 hora a 4°C. Tras 4 lavados de 5 minutos cada uno con PB 0,1M, las neuronas fueron post-fijadas con OsO₄ 2% durante 1 hora a temperatura ambiente y se tiñeron con acetato de uranilo 2% durante 2 horas a 4°C en oscuridad. Posteriormente se lavaron con agua destilada, se deshidrataron en etanol y se infiltraron en resina Durcupan (Sigma-Aldrich) toda la noche. Tras la polimerización, las neuronas embebidas en la resina se separaron de las cámaras de cultivo y se pegaron a bloques de araldita. Se cortaron en secciones semifinas (1,5 μm) con un Ultracut UC-6 (Leica) y se montaron en portaobjetos donde se tiñeron con azul de toluidina 1%. Las secciones semifinas seleccionadas se pegaron a bloques de araldita y se separaron del portaobjetos con ciclos de congelación en nitrógeno líquido y descongelación. Las secciones ultrafinas (0,06-0,08 μm) se prepararon con el Ultracut y se tiñeron con citrato de plomo. Finalmente se obtuvieron las imágenes en un microscopio de transmisión electrónica FEI Tecnai G2 Spirit (FEI Europe) usando una cámara digital Morada (Olympus Soft Image Solutions GmbH).

10.2. Análisis por microscopía óptica de transmisión vertical

Los ensayos celulares *in vivo* de los cultivos neuronales fueron examinados en un microscopio vertical Leica DMI3000B (Leica Microsystems Mannheim, Alemania) con control de temperatura. Las IFI de los cultivos neuronales fueron examinadas en un microscopio vertical de fluorescencia Leica DM RXA2 con un objetivo de aire de 40x.

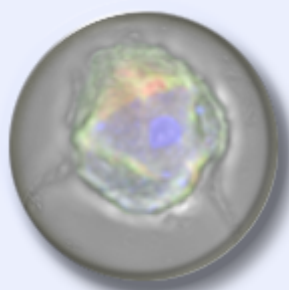
10.3. Análisis por microscopía confocal

Los ensayos celulares *in vivo* y las IFI de los cultivos neuronales fueron examinados en un microscopio confocal láser de barrido Leica TCS SP8, (Leica Microsystems Mannheim, Alemania) equipado con un microscopio invertido DMI6000. Los ensayos celulares *in vivo* de los cultivos neuronales se realizaron con control de la temperatura y del CO₂. Se tomó una imagen cada 0.22 μm de espesor de la neurona con objetivos 40x o 63x de aceite de inmersión. Las imágenes se reconstruyeron realizando una proyección máxima de los planos en el eje Z y montando los distintos canales de fluorescencia con el software ImageJ. La intensidad de la fluorescencia y los tamaños de área y diámetro de Feret se analizaron con el software ImageJ.

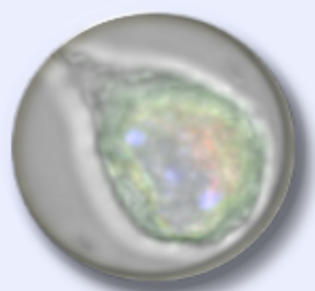
11. Análisis estadístico

La representación de los datos y obtención de los gráficos se llevó a cabo con el software GraphPad Prism 5.00.288 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo con los softwares Graphpad y SPSS para Windows versión 21.0 (Statistical Package for the Social Sciences, SPSS for Windows. Illinois, USA: Inc Chicago, 2005.).

Cada experimento se replicó al menos tres veces usando muestras biológicas o cultivos neuronales obtenidos a partir de tres animales diferentes por edad o condición (N=3). En cada una de las réplicas experimentales tanto el sacrificio, como el cultivo primario neuronal, como los experimentos se realizaron con los tres genotipos y con los distintos tratamientos al mismo tiempo en paralelo.



RESULTADOS



1. Identificación de nuevos marcadores específicos de neuronas propioceptivas del ganglio dorsal de ratón

La FRDA es una enfermedad caracterizada por la degeneración primaria del ganglio dorsal, en la que la falta de frataxina no afecta por igual a todos los tipos neuronales del ganglio dorsal. Éste hecho fisiopatológico nos llevó a cuestionarnos porque las neuronas propioceptivas son más sensibles a una deficiencia de frataxina. Para averiguar qué tienen de particular las neuronas propioceptivas, con respecto al resto de las neuronas sensitivas del ganglio dorsal, nos planteamos identificar nuevos marcadores de esta población neuronal. Para ello realizamos el aislamiento de las neuronas propioceptivas y el análisis de su perfil de expresión génica.

El modelo seleccionado para este estudio fue el ratón control C57BL/6J adulto de 12 meses de edad. Para secuestrar la subpoblación propioceptiva se eligió un sistema basado en la interacción biotina-estreptavidina. Las neuronas propioceptivas se marcaron con anticuerpos específicos biotinilados, que a su vez, fueron reconocidos por la estreptavidina unida a bolas magnéticas. De esta forma con un sencillo campo magnético se pueden recoger las bolas magnéticas de estreptavidina unidas a los anticuerpos biotinilados que han reconocido específicamente a la población propioceptiva en el ganglio dorsal disgregado. Para aislar la población propioceptiva se eligieron los anticuerpos anti-TrkC y anti-parvalbúmina (PV), que reconocen proteínas específicas de esta subpoblación neuronal [126, 127].

Previamente al aislamiento se quiso confirmar que los anticuerpos elegidos reconocen a sus proteínas nativas en la misma subpoblación de neuronas sensitivas. Para ello se realizó un cultivo primario de ganglio dorsal de un control C57BL/6J de 12 meses de edad sobre el que se realizó la inmunodetección con anti-TrkC y anti-PV a los 4 *div*. Las imágenes de microscopía muestran que sólo unas pocas de las neuronas sensitivas del cultivo mostraban la colocalización de los dos marcajes, indicando la correcta y específica detección de la población propioceptiva por los dos anticuerpos seleccionados (**Figura 24A**).

Una vez confirmada la idoneidad de los anticuerpos elegidos se realizó su biotinilación. La incubación del ganglio dorsal disgregado de un ratón C57 de 12 meses de edad con estos anticuerpos biotinilados, según la estrategia explicada en el apartado 7.1 de material y métodos, permitió el aislamiento de las neuronas propioceptivas (Prop) del resto del ganglio dorsal disgregado (Nop). Para confirmar la composición de cada una de las fracciones aisladas se realizó la inmunodetección de PV y β -tubulina III por WB en la fracción Prop, la Nop y en las bolas magnéticas, una vez completado el protocolo de aislamiento. El WB muestra que en las tres fracciones obtenidas se detecta β -tubulina III, revelando la presencia de neuronas. La detección de β -tubulina III en las bolas magnéticas indica que algunas de las neuronas propioceptivas aisladas se han quedado retenidas en las bolas magnéticas y no se han liberado correctamente. La detección de PV indica que se han aislado neuronas propioceptivas en la fracción Prop, pero también que han quedado algunas sin secuestrar en la fracción NoP (**Figura 24B**).

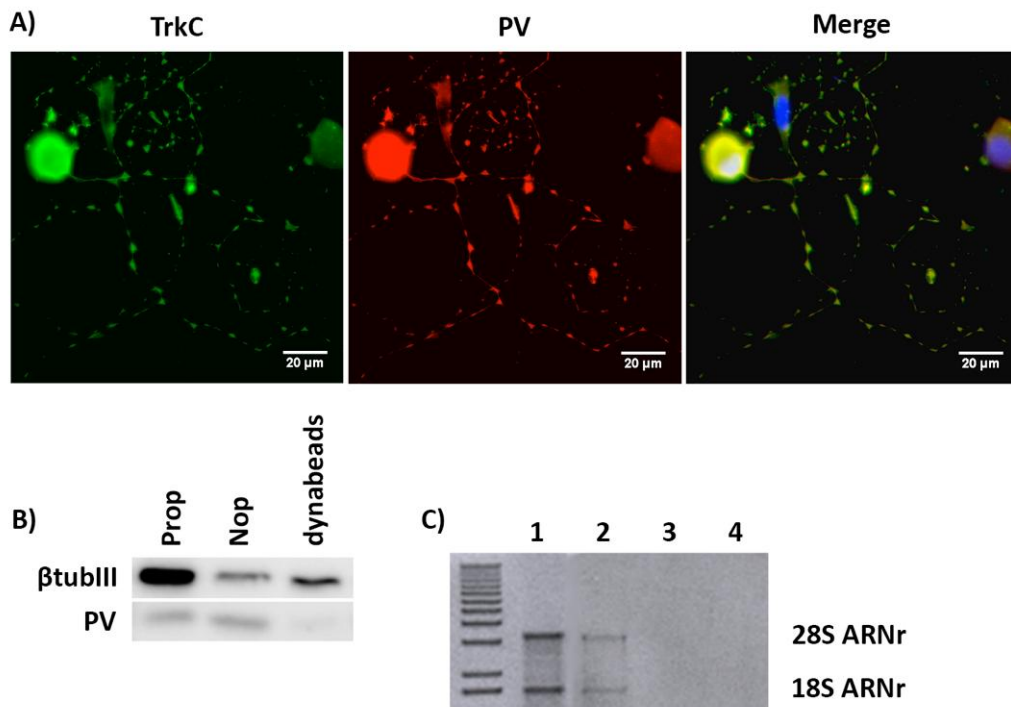


Figura 24. Aislamiento de la subpoblación de neuronas propioceptivas del ganglio dorsal.

A) Doble marcaje inmunocitoquímico de una neurona propioceptiva con sus marcadores específicos TrkC en verde y parvalbúmina (PV) en rojo en cultivo primario de neurona sensitiva de ratón adulto. 40x, microscopía vertical. **B)** Inmunodetección mediante WB de las subpoblaciones neuronales aisladas Prop, Nop y bolas magnéticas o dynabeads usadas en el aislamiento. **C)** Estudio de las bandas de RNA ribosomal en las subpoblaciones neuronales aisladas, línea 1 ganglio dorsal completo, línea 2 subpoblación Nop, línea 3 subpoblación Prop, línea 4 bolas magnéticas o dynabeads.

Una vez aislada la población propioceptiva del ganglio dorsal se pasó a la determinación y análisis de los perfiles de expresión génica, realizando un array específico de receptores de neurotrofinas y reguladores. Previamente a realizar el array quisimos comprobar la integridad del mRNA que se extrajo de la población propioceptiva aislada. Observamos que la cantidad de mRNA aislada de la fracción Prop era muy pequeña y, aunque se podía medir por espectrofotometría, no se detectó por electroforesis en gel de agarosa (**Figura 24C**). Por esta razón y, para estar seguros de que manejábamos una muestra de mRNA suficiente, el estudio de la expresión génica se realizó comparando la subpoblación NoP frente a la población de un ganglio dorsal completo. Por lo tanto los mRNA presentes en el ganglio dorsal completo y que estuvieron ausentes en la fracción NoP, corresponderían a la población propioceptiva.

El estudio del perfil de expresión genómica identificó 13 mRNA con expresión diferencial significativa (**Tabla 10**). Los tres mRNA con un menor nivel de expresión correspondieron a tres receptores neuronales: receptor tipo I de la adenilato ciclasa (PAC1R o ADCYAP1R1, *Adenylate cyclase receptor type I*), receptor 1 de la galanina (GALR1, *Galanin receptor 1*) y receptor tipo 2 de la hormona liberadora de corticotropina (CRHR2, *Corticotropin releasing hormone receptor 2*). Los tres receptores, que representan potenciales marcadores selectivos de neuronas propioceptivas, son miembros de la superfamilia de GPCR de clase II o Familia B o del receptor secretina.

Símbolo	Descripción	Av. Ratio	Función génica
ADCYAP1R1(PAC1R)	Adenylate cyclase receptor type I	-20.4762	N & R
GALR1	Galanin receptor 1	-6.5927	N & R, Galanin receptor
CRHR2	Corticotropin releasing hormone receptor 2	-6.0165	N & R
CRH	Corticotropin releasing hormone	-5.1154	N & R
NPY	Neuropeptide Y	-3.8882	N & R
GRPR	Gastrin-releasing peptide receptor	-2.8003	N & R, Bombesin receptors
NPY1R	Neuropeptide Y receptor Y1	-2.7986	N & R, Neuropeptide Y receptor
NTRK2	Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2	-2.6889	N & R, Neurogenesis
NRG4	Neuregulin 4	-2.4771	N & R, Growth factor
NPY2R	Neuropeptide Y receptor Y2	-3.914	N & R, Neuropeptide Y receptor
CRHR1	Corticotropin releasing hormone receptor 1	-3.649	N & R
GFRA1	GDNF family receptor alpha 1	-2.436	N & R, Neurogenesis (CNS Development)
Zfp91	Zinc finger protein 91	-2.014	N & R, Cell proliferation

Tabla 10. Expresión diferencial de mRNA asociado a la población propioceptiva. El listado muestra los mRNA que aparecen disminuidos en la población no propioceptiva (NoP) con respecto al ganglio completo, indicando que son representativos de la población propioceptiva (Prop). Se consideraron como potencial marcador específico de neurona propioceptiva todos aquellos mRNA que disminuyeron, al menos, dos veces en la muestra no propioceptiva (NoP) con respecto al ganglio completo.

Los nuevos receptores específicos de neuronas propioceptivas identificados, PAC1R, GALR1 y CRHR2, se validaron por inmunocitoquímica en cultivo primario de ganglio dorsal, mediante la colocalización con TrkC. Tanto la expresión del receptor PAC1R como la del receptor GALR1 colocalizan con la expresión del receptor TrkC en neuronas propioceptivas del cultivo primario de ganglio dorsal, por lo que se confirman como nuevos marcadores específicos de neuronas propioceptivas (**Figura 25**). Sin embargo el receptor CRHR2 se expresa en todos los tipos celulares del cultivo primario, incluyendo las neuronas no propioceptivas que no expresan TrkC, quedando descartado como posible marcador específico de neurona propioceptiva.

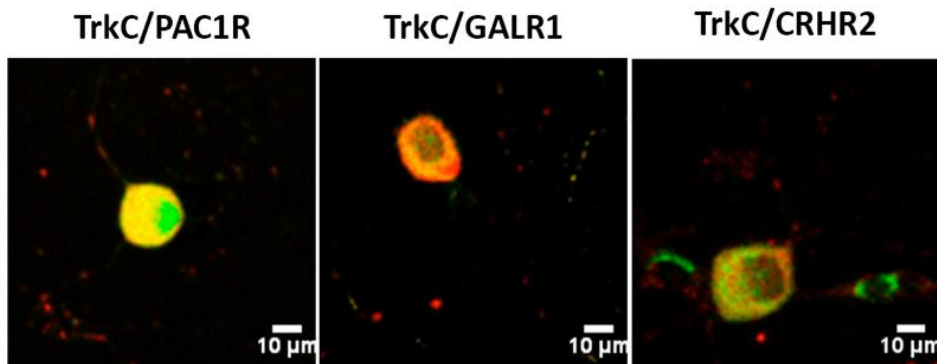


Figura 25. Patrones de expresión diferencial de las proteínas seleccionadas como candidatas a marcadores de propioceptivas.

Colocalización de la inmunofluorescencia del marcador de neurona propioceptiva TrkC (rojo) con la de las proteínas candidatas (verde). Se observa que la expresión de PAC1R y GALR1 está restringida a las neuronas sensitivas propioceptivas, sin embargo la expresión de CRHR2 se observa en las neuronas propioceptivas pero además presenta un marcaje perinuclear en células no neuronales. Imágenes de confocal 63x.

En 2005 Kramer realizó un estudio muy similar en el que comparó la expresión génica del ganglio dorsal de embriones deficientes en TrkC con el control e identificó 41 genes como potenciales marcadores de neuronas propioceptivas. De todos ellos eligió dos miembros de la superfamilia GPCR, Me6/Gpr64 y Pthr1, y los confirmó como marcadores noveles de neuronas propioceptivas implicados en su diferenciación a lo largo de la etapa embrionaria [128]. Estos datos sugieren que los GPCR juegan un papel relevante en la biología de las neuronas propioceptivas.

La identificación de dos nuevos marcadores predominantes en las neuronas propioceptivas del ganglio dorsal en ratón adulto, PAC1R y GALR1, pertenecientes a la familia de GPCR de clase II, aporta nuevas vías moleculares y procesos celulares de estudio que pueden estar implicados en la FRDA.

PACAP es un neuropéptido implicado en la regeneración nerviosa, la supervivencia neuronal y la nocicepción. Su expresión aumenta en las neuronas más grandes o propioceptivas después de algunos tipos de daño nervioso periférico como una transección [99, 100]. La vía PACAP/PAC1R ha sido descrita ampliamente como una vía de supervivencia en multitud de daños nerviosos y tipos neuronales del SNC y SNP y juega un papel importante en la recuperación post-traumática del sistema nervioso. El hecho de que PACAP aumente en la población propioceptiva tras un daño periférico y de que hayamos identificado PAC1R como receptor más sobrerrepresentado en la población propioceptiva sugiere PAC1R como diana molecular emergente con potencial terapéutico en la respuesta a la neurodegeneración en la FRDA.

La galanina es un neuropéptido inhibitorio ampliamente distribuido en SNP y SNC para el que se han descrito tres receptores acoplados a proteína G: GalR1, GalR2 y

GalR3. La unión de galanina a GalR1 inhibe la AC y la unión a GalR2 activa la PLC, por ello GalR1 es un receptor inhibitorio y GalR2 es un receptor excitatorio [129, 130]. En el ganglio dorsal GalR1 se expresa mayoritariamente en las neuronas propioceptivas, pero también en nociceptivas y mecanoceptivas [131]. La expresión de galanina aumenta drásticamente en las neuronas nociceptivas y propioceptivas después de un daño en el nervio periférico [131], confiriendo analgesia después del daño, procesando la información sensitiva especialmente del dolor y promoviendo la supervivencia y la regeneración neuronal [132]. El GalR1 se ha implicado en la protección frente a un daño excitotóxico por kainato [133], y en la respuesta nocifensiva frente a un estímulo de frío/calor [130]. El hecho de que GalR1 se exprese mayoritariamente en las neuronas propioceptivas, confirma nuestra validación como marcador sobrerrepresentado en la población propioceptiva. Sin embargo la implicación de GalR1 con procesos nociceptivos tras el daño neurológico y la implicación de GalR2 con los procesos de crecimiento y regeneración neurítica, disminuye la posibilidad de que GalR1 pueda estar implicado en la respuesta frente a la neurodegeneración en las neuronas propioceptivas en la FRDA.

La implicación de los GPCR en el desarrollo de las neuronas propioceptivas, en la respuesta a las enfermedades neurodegenerativas y la identificación de la vía de supervivencia PACAP/PAC1R como específica de las neuronas propioceptivas hace suponer que posiblemente la señalización neuronal a través de los GPCR está implicada en la fisiopatología de la FRDA. Una mayor comprensión de cómo el déficit de fraxina puede alterar los mecanismos moleculares y celulares a través de los cuales los GPCR tipo II modulan la plasticidad y supervivencia neuronal, permitirá nuevas intervenciones terapéuticas en la FRDA.

2. Estudio fisiopatológico del déficit de frataxina en el modelo murino FRDA

2.1. La expresión de frataxina correlaciona con el número de copias del transgén YG8

En autopsias de pacientes de FRDA se ha encontrado una acumulación progresiva de expansiones grandes del triplete GAA en el ganglio dorsal [134] y en el cerebelo [135] de forma dependiente a la edad, que se postula que puede contribuir a la patología tisular específica y progresiva de la enfermedad. Esta inestabilidad somática entre los tejidos en FRDA ocurre mucho después del desarrollo embrionario y progresa a lo largo de la vida [134]. En el modelo murino transgénico YG8 también se describió una inestabilidad intergeneracional y una inestabilidad somática del triplete GAA en cerebelo y médula espinal, a partir de la generación F4. Los autores argumentaron que era debido al efecto del fondo genético C57BL/6J [40]. Estudios posteriores confirmaron que la inestabilidad somática del transgén YG8 en ganglio dorsal y cerebelo es dependiente de la edad y además es mayor que en tejidos replicativos como la sangre o el esperma, por lo que pensaron que la replicación del DNA no está implicada en la inestabilidad dependiente de la edad entre los tejidos, sino que debe ser la vía de reparación del DNA la que juega un papel crítico en esta inestabilidad somática en el ratón [135].

En la colonia del modelo FRDA amplificada en nuestro laboratorio no se detectó inestabilidad intergeneracional de las repeticiones GAA en el transgén YG8. No aparecieron ni contracciones ni expansiones del número de repeticiones del triplete GAA, debido a que la colonia se amplificó en un corto período de tiempo con individuos de la misma generación F (transversalmente) y no se ha descendido más de 3 generaciones (F3). Por lo tanto, todos los ratones estudiados presentaban el mismo número de repeticiones GAA a la edad de 10 días. La inestabilidad somática entre los tejidos debida a la edad no se ha determinado, pero posiblemente de haberse producido estaría favoreciendo la evolución del proceso fisiopatológico a las edades de estudio de 22-24 meses.

El genotipado de la colonia se realizó mediante dos PCR convencionales utilizando como molde el DNA de los ratones. Una primera PCR identifica el gen *Fxn* (**Figura 26A**) y la segunda determina la presencia del transgén YG8 (**Figura 26B**). El tamaño amplificado depende del número de repeticiones del triplete GAA que contiene el transgén y se calcula según la fórmula: $457 \text{ pb} + 3 n$ ($n = n^\circ$ de repeticiones GAA). Se han incluido otros genotipos de ratón obtenidos de cruces entre heterocigotos ($Fxn^{+/-}$, FXN^+) para poder observar todos los genotipos posibles.

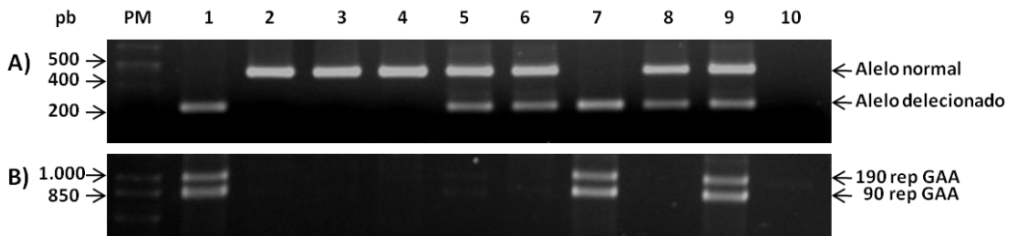


Figura 26. Genotipado y fenotipado del modelo murino FRDA.

A) Productos de la PCR del gen de la frataxina murina (*Fxn*). La banda de 250 pb corresponde al alelo deleciónado y la banda de 450 pb al alelo normal. **B)** productos de PCR del transgén YG8 con (GAA)₉₀₊₁₉₀. El DNA de los ratones *FXN*⁺ o *FXN*^{+/-} amplificaron dos bandas de 1.027 pb y 727pb, correspondientes a 190 y 90 repeticiones del triplete GAA. Línea 1 y 7 ratón (*Fxn*^{-/-}, *FXN*⁺), línea 2, 3 y 4 (*Fxn*^{+/-}), ratón línea 5, 6 y 8 ratón (*Fxn*^{+/-}), línea 9 ratón (*Fxn*^{+/-}, *FXN*⁺), línea 10 control negativo o blanco de la reacción.

Debido al tipo de cruces que realizamos entre individuos YG8R “rescatados” (*Fxn*^{-/-}, *FXN*⁺), obtenemos ratones YG8R con una copia del transgén YG8 en hemizigosis (*Fxn*^{-/-}, *FXN*⁺) y ratones YG8YG8R con dos copias del transgén YG8 en homocigosis (*Fxn*^{-/-}, *FXN*^{+/-}). La determinación del número de copias del transgén de cada uno de los ratones se realizó por PCR cuantitativa.

El ratón YG8R es un modelo que reproduce molecularmente la mutación típica de los pacientes FRDA. En estos pacientes, el incremento en el número de repeticiones es lo que impide una correcta transcripción del gen y por tanto alcanzar niveles adecuados de la proteína frataxina. Una de las cosas que nos preocupaba en el modelo era confirmar que los niveles de expresión de frataxina eran inferiores a lo normal y por tanto patológicos. El modelo no dispone de un control de expresión basal de frataxina humana, pero por el tipo de cruce que estábamos realizando sí que disponíamos de un ratón con dos copias del transgén y por tanto debería presentar una expresión superior de frataxina. Para confirmar este hecho, realizamos una extracción de proteína de tejido neuronal de ratones YG8R, YG8YG8R y del control C57BL/6J. También añadimos el ratón *wild type* (*Fxn*^{+/-}) obtenido en cruces de heterocigotos (*Fxn*^{+/-}, *FXN*⁺). La inmunodetección por WB revela que la frataxina humana expresada presenta las dos formas procesadas en la mitocondria, la intermedia de 17 KDa y la madura de 14 KDa. Y que la forma madura se expresa de forma predominante con respecto a la intermedia. La expresión mayoritaria de la forma madura ocurre en la mayoría de las especies, en individuos normales y en pacientes de FRDA, y es la forma completamente funcional esencial para la supervivencia celular [136]. En nuestro caso, observamos una mayor expresión de la frataxina humana en el tejido de los ratones YG8YG8R, con dos copias del transgén, que en los ratones YG8R, con una sola copia (**Figura 27**).

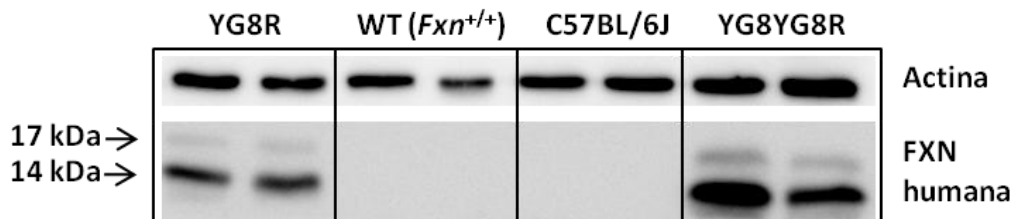


Figura 27. Inmunodetección por WB de frataxina humana en columnas posteriores del ratón FRDA.

Se aprecian dos bandas correspondientes a las formas maduras mitocondriales de 17 KDa y 14 KDa. Se aprecia una mayor expresión de la frataxina humana en el tejido neuronal de los ratones YG8YG8R que en los ratones YG8R. Los controles C7BL/6J y los *wild type* (*Fxn*^{+/+}) obtenidos de cruces de heterocigotos no expresan frataxina humana.

Por tanto el modelo murino FRDA expresa una cantidad de frataxina humana en tejido neuronal, en concreto las formas maduras mitocondriales, proporcional al número de copias del transgén YG8. Con este resultado, nos decidimos a realizar los siguientes estudios utilizando tres ratones: YG8R, como ratón problema; YG8YG8R, con mayor expresión de frataxina y por tanto esperando observar una mejora progresiva de la patología; y C57BL/6J como control.

2.2. Caracterización fenotípica del modelo murino FRDA

2.2.1. El déficit de frataxina provoca el aumento del peso corporal del modelo murino FRDA

Se realizó un seguimiento del peso corporal desde los 3 meses hasta los 24 meses de edad. El estudio del peso corporal en el modelo murino FRDA reveló un incremento de peso en los genotipos YG8R e YG8YG8R con respecto al control C57BL/6J desde los 6 meses de edad hasta los 24 meses, con diferencias significativamente estadísticas en los machos, pero no en las hembras. No hay diferencias significativas en el peso entre YG8R e YG8YG8R ni en machos ni en hembras (**Figura 28**).

El aumento del peso corporal en el modelo murino FRDA en ambos sexos es coincidente con los resultados publicados previamente por Al-Mahdawi y colaboradores (2006) en el que determinaron un aumento de peso corporal del genotipo YG8R. Para el autor la razón de este aumento de peso se debe a la menor movilidad que presenta el genotipo YG8R en la prueba de campo abierto, concluyendo que el ratón deficiente en frataxina YG8R presenta un déficit locomotor que le hace moverse menos en la jaula y aumentar el peso corporal.

En el **anexo I** se detallan los valores de media \pm SEM, número de animales y parámetros estadísticos para cada grupo de edad y sexo.

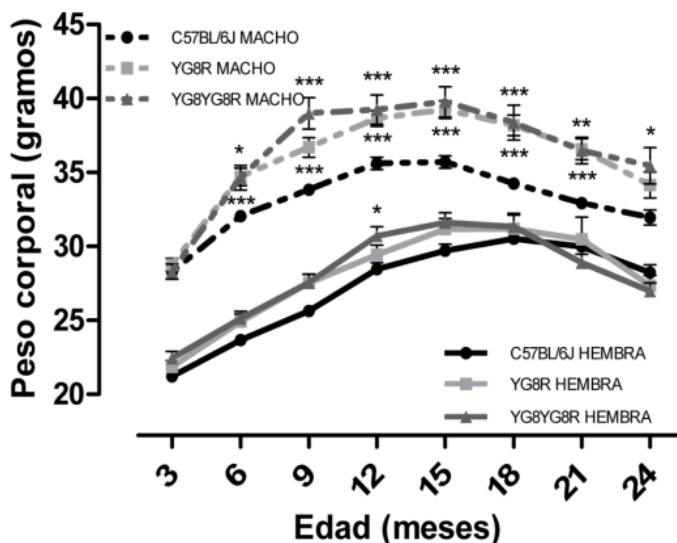


Figura 28. Peso corporal en el modelo murino FRDA.

La gráfica representa la media \pm SEM. Análisis ANOVA multifactorial (edad*genotipo) y nivel de significación * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

2.2.2. El déficit de frataxina no influye en la supervivencia del modelo murino FRDA

Se realizó un seguimiento de la supervivencia desde el nacimiento hasta la edad de experimentación de 22 meses de edad. Los resultados del análisis de la supervivencia indican que la edad máxima de vejez, con un 85% de supervivencia, es de 20 meses para los tres genotipos en ambos sexos (**Figura 29A-B**). Indicando que los ratones deficientes en frataxina llegan a la edad de envejecimiento en las mismas condiciones y comienzan el envejecimiento a la misma edad que el control C57BL/6J en ambos sexos. El análisis de la supervivencia no pudo determinar el tiempo de vida media de cada uno de los genotipos y sexos porque todos ellos presentan más del 50% de supervivencia al finalizar el estudio a los 22 meses de edad (**Figura 29A-B**).

El análisis de la supervivencia indicó que las curvas de supervivencia de los tres genotipos son iguales hasta los 22 meses de edad en ambos sexos (**Figura 29A-B**), con excepción de los machos YG8YG8R (**Figura 29A**), que presentan una ligera disminución de la supervivencia con respecto al control C57BL/6J, ($F=3.862$, $p=0.0494^*$). Las curvas de supervivencia dentro de un genotipo son iguales para ambos sexos, sin diferencias significativas, por lo que el sexo no es un factor que influya en las curvas de supervivencia.

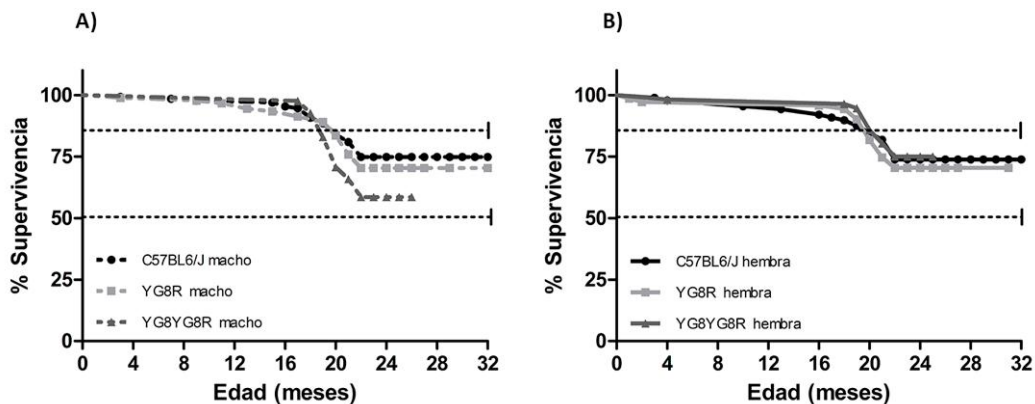


Figura 29. Curvas de supervivencia del modelo murino FRDA.

Las curvas de supervivencia representan el porcentaje de animales vivos en cada una de las edades hasta la edad de experimentación de 22 meses. A partir de los 23 meses de edad se muestran los casos censurados por experimentación y por muerte natural. La línea de puntos al 85% de supervivencia representa la edad de vejez y al 50% de supervivencia representa la vida media. **A)** Los machos YG8R no presentan diferencias significativas en la supervivencia con respecto al control C57BL/6J, sin embargo los machos YG8YG8R sí presentan una ligera diferencia significativa en las curvas de supervivencia con respecto al control C57BL/6J. **B)** las hembras YG8R e YG8YG8R no presentan diferencias significativas con respecto al control. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier.

Así pues podemos afirmar que ni la deficiencia de frataxina ni el sexo son factores que intervienen en la supervivencia del modelo murino FRDA, sólo la asociación del genotipo YG8YG8R con el sexo masculino influye ligeramente en la supervivencia antes del tiempo de experimentación.

Debido al aumento del peso corporal que muestran los ratones deficientes en frataxina con respecto al control C57BL/6J, de forma significativa sólo en los machos, nos pareció interesante estudiar la influencia del peso corporal en la supervivencia del modelo FRDA y confirmar si es la covariable que hace que los machos YG8YG8R tengan una supervivencia ligeramente inferior. Para ello realizamos una regresión de Cox que permite analizar el riesgo de las distintas variables y averiguar el orden de importancia de cada una de ellas sobre la supervivencia.

Primero se realizó el análisis univariante de cada una de las variables independientes genotipo, sexo, genotipo*sexo y peso corporal individualmente. La regresión de Cox confirmó los resultados obtenidos en las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier, ni el genotipo, ni el sexo, ni el genotipo*sexo son factores que intervienen en la supervivencia, de forma que todos los genotipos, sexos y genotipos*sexo tienen la misma probabilidad de presentar muerte natural. Ahora bien, el peso corporal sí es una variable que interviene significativamente en la supervivencia (Wald=8.197; $p=0.004^{**}$; $\text{Exp}(B)=1.039$).

En segundo lugar se estudió el orden de repercusión de cada una de las variables sobre la supervivencia con el análisis multivariante de regresión de Cox hacia adelante. Se introdujeron todas las variables estudiadas: el genotipo, el sexo, el genotipo*sexo y el peso corporal, y sólo este último entró en el modelo final (riesgo

relativo = 1.039; $p = 0,004^{**}$), indicando que el peso corporal es el mejor factor pronóstico de muerte natural en el modelo FRDA. Parece que el aumento de peso corporal que presentan los machos deficientes en frataxina, es un factor de riesgo para la supervivencia del modelo FRDA, aunque el propio genotipo en sí no lo es.

En el modelo FRDA la edad de estudio elegida de 22-24 meses es una edad que está por encima de la edad media de supervivencia del modelo, sobrepasa en 2 meses la edad máxima de vejez, y es una edad en la que no existen diferencias en la supervivencia entre los ratones deficientes en frataxina y el control C57BL/6J. Por lo tanto la edad de estudio elegida nos va a permitir observar las consecuencias de la fisiopatología provocada por el déficit de frataxina en condiciones de vejez. Los machos y hembras de cada genotipo tienen las mismas curvas de supervivencia y el sexo no es un factor de riesgo para la supervivencia, por lo que no se ha hecho distinción de sexos durante los estudios que no lo requerían.

En el **anexo II** se detallan número de animales, tablas de supervivencia y parámetros estadísticos para cada grupo de edad y sexo.

2.2.3. Los ratones deficientes en frataxina presentan defectos en la coordinación motora, el equilibrio y la propiocepción

La evaluación del comportamiento locomotor del modelo murino FRDA se realizó en las hembras, debido a que su peso corporal no aumenta significativamente, como en el caso de los machos, con respecto al control C57BL/6J. De esta forma se elimina el peso corporal como posible factor que modifique la capacidad locomotora del ratón YG8R.

2.2.3.1. Prueba del rotarod

Se realizó un seguimiento mensual de la coordinación motora y el equilibrio del modelo FRDA desde los 2 meses hasta los 9 meses de edad mediante la prueba del rotarod. Los resultados muestran que los ratones YG8R presentan un déficit locomotor a partir de los cuatro meses de edad y los ratones YG8YG8R lo presentan de forma más tardía a los seis meses de edad (**Figura 30A**). En ambos ratones el déficit locomotor va empeorando con la edad de forma estadísticamente significativa con respecto al control C57BL/6J.

El modelo FRDA presenta una edad de aparición y una gravedad de la deficiencia en la coordinación motora que se correlacionan de forma gradual al número de copias del transgén YG8 o a la cantidad de frataxina humana que se expresa en el ratón.

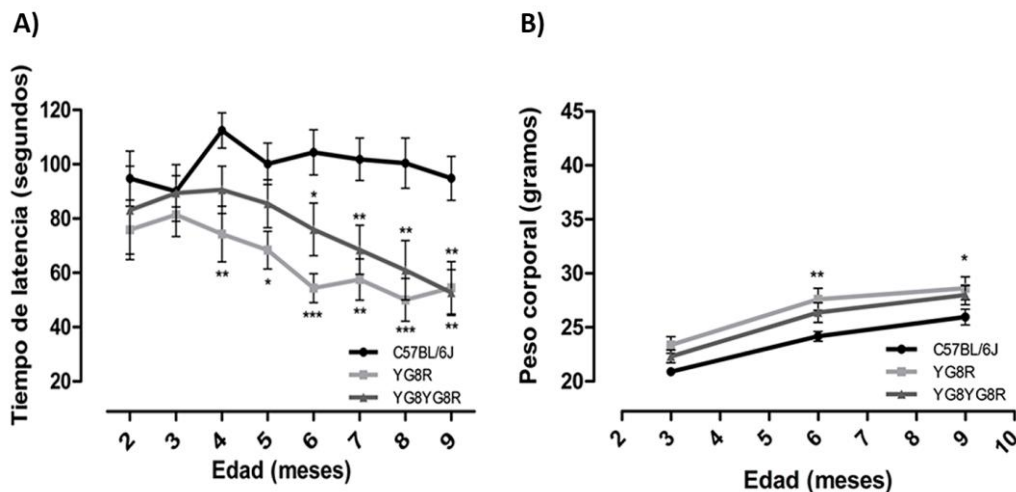


Figura 30. Prueba del ROTAROD en el modelo murino FRDA.

A) La gráfica representa el tiempo que cada genotipo aguanta realizando el ejercicio en el rotarod a cada una de las edades evaluadas. YG8R e YG8YG8R presentan diferencias significativas con respecto al control C57BL/6J en el tiempo en caer del eje rotatorio. Los datos representan la media \pm SEM de 4 ensayos con 4 repeticiones de 25, 14 y 18 ratones C57BL/6J, YG8R e YG8YG8R, respectivamente, por edad. **B)** Peso corporal de las hembras durante la prueba de rotarod, YG8R e YG8YG8R presentan aumento del peso con respecto al control. Los datos representan la media \pm SEM del peso corporal a cada una de las edades. Análisis ANOVA multifactorial (edad*genotipo) y nivel de significación * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

Los resultados del ANOVA multifactorial ($F=4.718$, $p=0.000^{***}$) indican que el modelo (edad*genotipo) explica de forma significativa la variación observada en el tiempo de latencia en el rotarod y que la interacción edad*genotipo posee un efecto significativo sobre el tiempo de latencia en el rotarod a partir de los cuatro meses de edad. Hay que observar que los pesos corporales de estas hembras son significativamente mayores que los controles (**Figura 30B**) y podrían estar interfiriendo en la ejecución del test locomotor. Los resultados del ANCOVA multifactorial ($F=5.037$, $p=0.000^{***}$) confirman que el modelo (edad*genotipo), con el peso corporal como cofactor, continúa explicando de forma significativa la variación observada en el tiempo de latencia en la prueba del rotarod, por lo que el peso corporal no es un factor que intervenga en el tiempo de latencia ($F=2.432$, $p=0.121$).

En el **anexo III** se detallan los valores de media \pm SEM, número de animales y parámetros estadísticos para cada grupo de edad.

2.2.3.2. Prueba de la barra de equilibrio

Se realizó un seguimiento mensual de la coordinación motora y el equilibrio del modelo FRDA desde los 10 meses hasta los 15 meses de edad mediante la prueba de la barra de equilibrio. Esta prueba es más sensible que el rotarod para aquellos casos en los que la deficiencia motora es más débil o sutil. Los resultados muestran que en ambos ratones deficientes el déficit locomotor aparece a los once meses de edad y va empeorando con la edad, aunque de forma más acusada en el ratón YG8R, ya que el ratón YG8YG8R se mantiene más cercano al control C57BL/6J, (**Figura 31A-C**). Se observa de forma evidente la dependencia de la capacidad locomotora y del equilibrio con la cantidad de frataxina a los 14 y 15 meses de edad en la barra más ancha de 26 mm, en la que las diferencias entre YG8R e YG8YG8R se hacen estadísticamente significativas (**Figura 31A**).

El ancho de la barra ilustra a la perfección las diferencias entre los genotipos, y su dependencia con el déficit gradual de frataxina. La barra más ancha de 26 mm representa una dificultad para el genotipo YG8R, pero no para el YG8YG8R que se acerca a los tiempos del control C57BL/6J (**Figura 31A**). La barra de ancho intermedio de 12 mm ya le resulta difícil también al YG8YG8R que se aleja de los tiempos del control C57BL/6J y se acerca más a los tiempos del YG8R (**Figura 31B**). La barra más estrecha de 5 mm es un impedimento para los tres genotipos por igual y aunque mantienen las diferencias en los tiempos de cruzar pierden la significación estadística porque se acercan entre sí (**Figura 31C**). La potencia de la prueba de la barra de equilibrio para detectar deficiencias en la coordinación motora y el equilibrio es mayor que la del rotarod y por ello la significación estadística de las diferencias entre los tres genotipos estudiados también es mayor que la del rotarod.

La prueba de la barra de equilibrio ha confirmado que el modelo FRDA presenta una edad de aparición y una gravedad de la deficiencia en la coordinación motora que se correlaciona de forma gradual al número de copias del transgén YG8 o a la cantidad de frataxina humana que se expresa en el ratón.

Los resultados del ANOVA multifactorial ($F=11.498$, $p=0.000^{***}$) indican que el modelo (edad*genotipo*ancho de barra) explica una parte significativa de la variación observada en el tiempo de cruzar la barra y que la interacción edad*genotipo*ancho de barra posee un efecto significativo sobre el tiempo de cruzar la barra. Hay que observar que los pesos corporales de las hembras deficientes en frataxina son mayores que los controles (**Figura 31D**) aunque no estadísticamente significativos, y podría ser un factor que interfiera en la ejecución del test locomotor.

Los resultados del ANCOVA multifactorial ($F=11.314$ $p=0.000^{***}$) indican que el modelo (edad*genotipo*ancho de banda), con el peso corporal como cofactor, continúa explicando una parte significativa de la variación observada en el tiempo de cruzar la barra, por lo que el peso corporal no es un factor que intervenga en el tiempo de cruzar las barras.

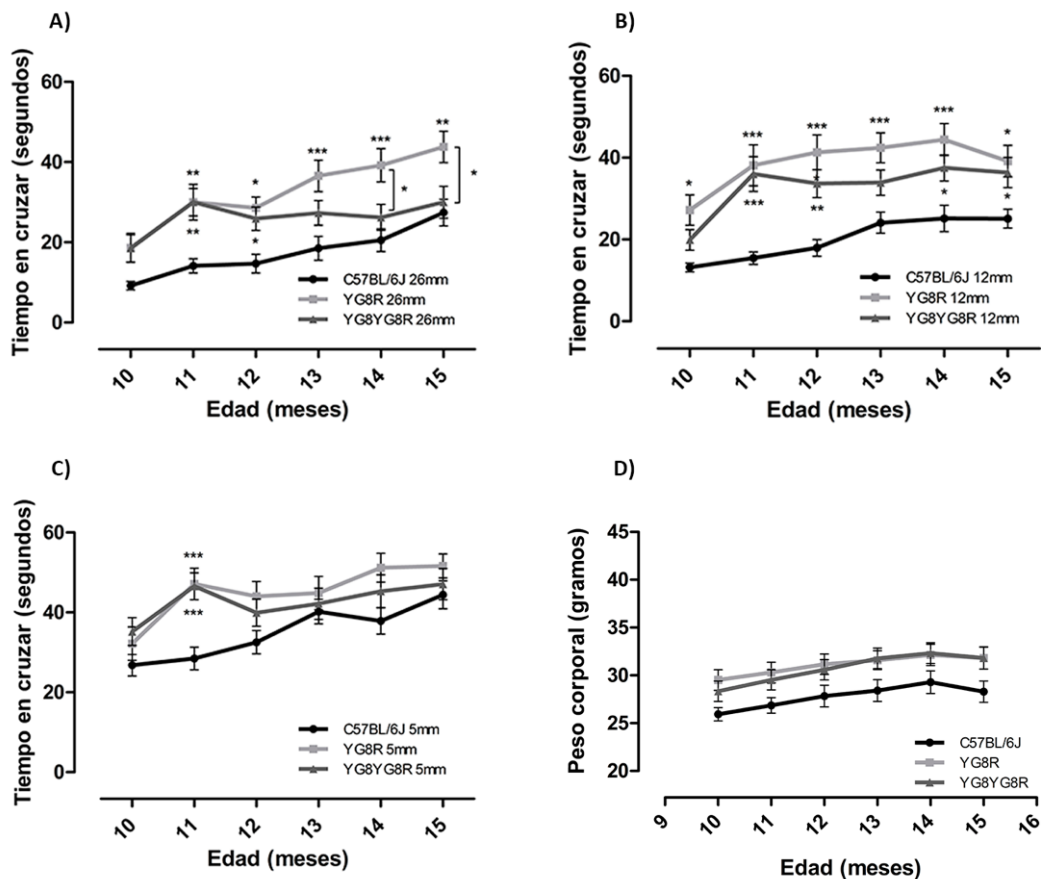


Figura 31. Prueba de la barra de equilibrio en el modelo murino FRDA.

A-C) Las gráficas representan el tiempo que cada genotipo tarda en cruzar las barras de 26, 12 y 5 mm a cada una de las edades evaluadas. YG8R e YG8YG8R presentan diferencias significativas con respecto al control C57BL/6J en el tiempo en cruzar las barras. Los datos representan la media \pm SEM de 1 ensayos con 3 repeticiones de 25, 14 y 18 ratones C57BL/6J, YG8R e YG8YG8R, respectivamente, por edad. **D)** Peso corporal de las hembras durante la prueba de rotarod, YG8R e YG8YG8R presentan aumento del peso con respecto al control. Los datos representan la media \pm SEM del peso corporal a cada una de las edades. Análisis ANOVA multifactorial (edad*genotipo*ancho de barra) y nivel de significación * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

En el **anexo III** se detallan los valores de media \pm SEM, número de animales y parámetros estadísticos para cada grupo de edad y ancho de barra de equilibrio.

2.2.3.3. Prueba del palo

Se realizó un seguimiento mensual de la aparición de trastornos del movimiento y de la postura relacionados con el ganglio basal, también llamados síntomas extrapiramidales, del modelo FRDA desde los 10 meses hasta los 15 meses de edad mediante la prueba del palo. Los resultados muestran que las hembras YG8R presentan un tiempo de actividad locomotora mayor con respecto al control C57BL/6J (Figura 32A).

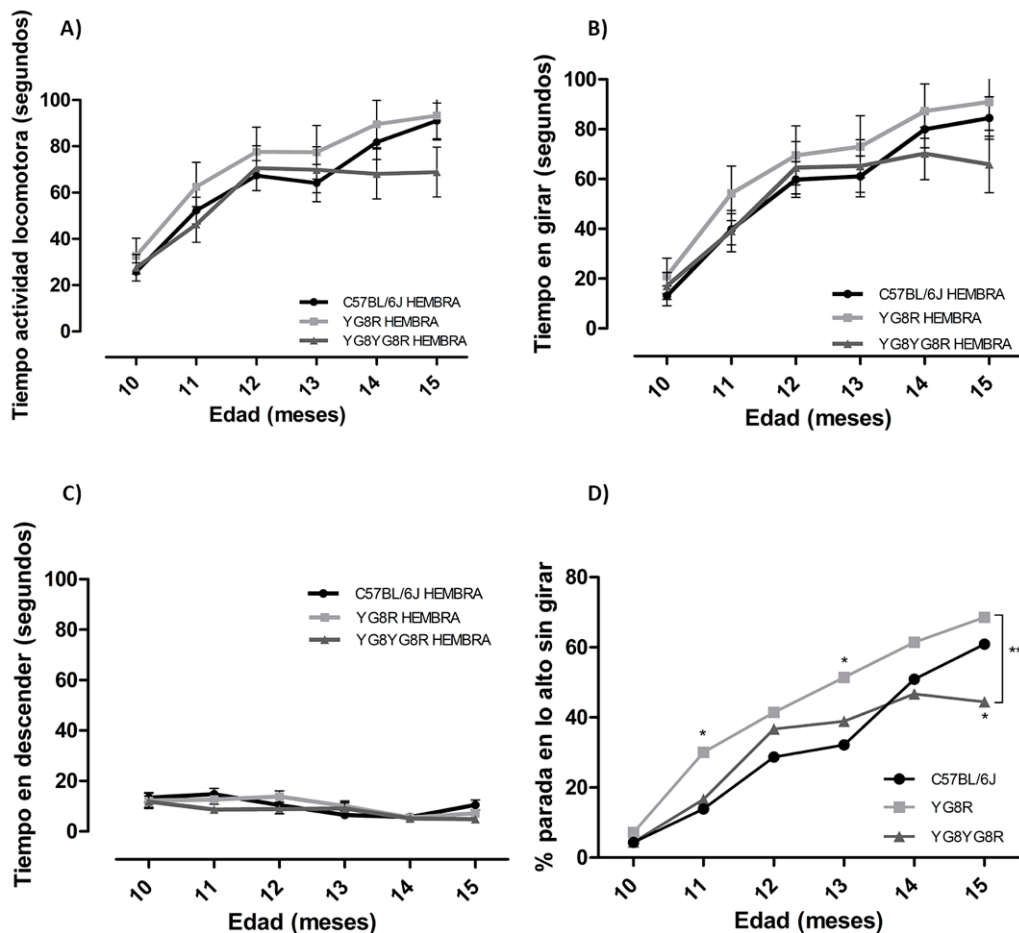


Figura 32. Prueba del palo en el modelo murino FRDA.

A) La gráfica representa el tiempo que cada genotipo tarda en girarse sobre sí mismos y en descender hasta la plataforma a cada una de las edades evaluadas. El genotipo YG8R tarda más tiempo en realizar la prueba completa, con respecto al control C57BL/6J. **B)** La gráfica representa el tiempo que cada genotipo tarda en girarse sobre sí mismos a cada una de las edades evaluadas. YG8R tarda más tiempo en girarse, con respecto al control C57BL/6J. **C)** La gráfica representa el tiempo que cada genotipo tarda en descender hasta la plataforma a cada una de las edades evaluadas. No hay diferencias entre los genotipos. **D)** La gráfica representa el porcentaje de animales de cada genotipo que se queda en lo alto del palo sin girar y sin realizar el ejercicio a cada una de las edades evaluadas. Los datos representan la

media \pm SEM de 1 ensayos con 5 repeticiones de 25, 14 y 18 ratones C57BL/6J, YG8R e YG8YG8R, respectivamente, por edad. Análisis ANOVA multifactorial (edad*genotipo) para las variables cuantitativas, tabla de contingencia con test exacto de Fisher para el porcentaje de parada en lo alto del palo y nivel de significación * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

Este aumento del tiempo que necesitan para realizar la prueba no se debe al tiempo que tardan en descender, que es el mismo en los tres genotipos, (**Figura 32C**) sino al tiempo que tardan en darse la vuelta sobre sí mismas (**Figura 32B**). Además el porcentaje de animales que se quedan en lo alto del palo sin darse la vuelta y descender revela que las hembras YG8R se quedan más veces en lo alto del palo sin girar y sin comenzar el descenso, de forma estadísticamente significativa, con respecto al control C57BL/6J (**Figura 32D**).

La prueba del palo ha confirmado que el modelo FRDA presenta un déficit en la capacidad de orientarse y darse la vuelta sobre sí mismo, indicando un defecto en la sensibilidad propioceptiva, de forma dependiente al número de copias del transgén YG8R o a la cantidad de frataxina humana que se expresa en el ratón.

En el **anexo III** se detallan los valores de media \pm SEM, número de animales y parámetros estadísticos para cada grupo de edad y sexo.

2.3. Estudio de la fisiopatología tisular del déficit de frataxina

Para saber más sobre las consecuencias de la deficiencia de frataxina y la implicación de la disfunción mitocondrial en la neuropatía axonal *dying-back* se estudiaron distintas vías de neurodegeneración en diferentes niveles topográficos del sistema nervioso. Se eligieron los tejidos más afectados en los pacientes de FRDA como tejidos de referencia. Se extrajeron ganglios dorsales y raíces de los nervios espinales del SNP de ratones C57BL6/J (N=3) e YG8R (N=5). Y como tejidos del SNC se obtuvieron las columnas posteriores de la médula espinal y el tronco del encéfalo de ratones C57BL6/J (N=4) e YG8R (N=4). El estudio se programó para realizarse a los 18-21 meses de edad debido a que Al-Mahdawi y colaboradores (2006) encontraron afectación del ganglio dorsal, con la aparición de vacuolas, a partir de los 18 meses de edad en el ratón YG8R. Por lo que decidimos esperar hasta los 18 y 21 meses de edad esperando encontrar una mayor afectación neuronal, como confirmaban los déficits de equilibrio y de posicionamiento que presentan los ratones YG8R a partir de los 11 meses de edad en las pruebas de la barra de equilibrio y del palo.

2.3.1. La frataxina presenta una expresión diferencial entre los tejidos neuronales

Primero quisimos valorar los niveles de frataxina humana en el ratón YG8R en los tejidos neuronales descritos anteriormente. Para ello tras la obtención de los tejidos se realizó una extracción de proteínas y se analizaron por WB. Los resultados muestran que las raíces periféricas expresan la menor cantidad de frataxina humana y después el ganglio dorsal, cordones posteriores y tronco del encéfalo (**Figura 33**). El ratón YG8R muestra una expresión diferencial de frataxina humana en los distintos

tejidos neuronales estudiados, indicando que la expresión va aumentando de forma gradual en los distintos tejidos neuronales conforme se avanza del SNP al SNC.

La frataxina se expresa en todas las células, pero de forma variable entre los tejidos y las etapas del desarrollo, siendo más alta en las células ricas en mitocondria como cardiomiocitos y neuronas. El humano, en la edad adulta, presenta los niveles de frataxina más abundantes en el corazón, el cerebro y la médula espinal, seguido del hígado, el músculo esquelético y el páncreas [9]. Nuestros resultados confirman que la expresión en la médula espinal del SNC es mayor que en el ganglio dorsal y las raíces del SNP. Esta baja expresión de frataxina en el ganglio dorsal puede estar acrecentada por la inestabilidad somática dependiente de la edad que presenta el transgén YG8 en el ganglio dorsal [14, 135] y que impide de una forma más acusada su transcripción y expresión en el ratón de 18-21 meses de edad.

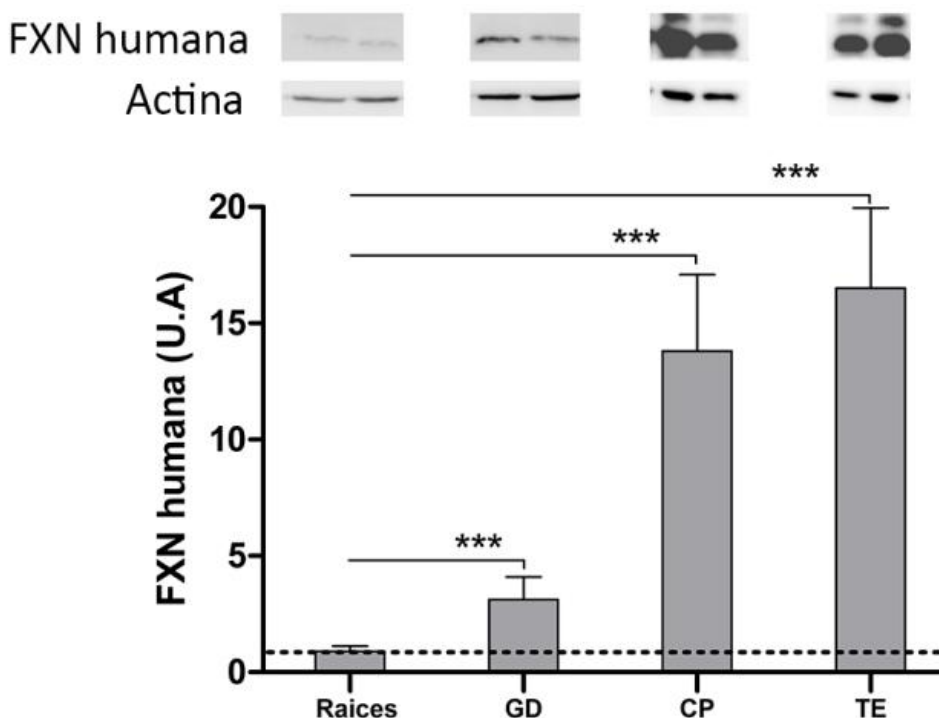


Figura 33. Expresión diferencial de frataxina en tejidos neuronales del modelo murino FRDA.

Cuantificación de los niveles de frataxina humana normalizados con la actina del tejido neuronal de raíces, GD (ganglio dorsal), CP (Columnas posteriores) y TE (tronco del encéfalo) en el ratón deficiente YG8R (N=4-5). Se acompaña de una imagen representativa de la inmunodetección por WB. Análisis ANOVA unifactorial (genotipo) y nivel de significación ***p<0.001.

2.3.2. Los tejidos neuronales deficientes en frataxina muestran afectación mitocondrial y estrés oxidativo

Después de confirmar los niveles de expresión de frataxina humana en cada uno de los tejidos neuronales pasamos a estudiar la expresión de marcadores de función mitocondrial y de cantidad de masa mitocondrial y de procesos celulares como estrés oxidativo, apoptosis y autofagia.

Observamos que el ratón YG8R muestra una disminución significativa de las subunidades proteicas COXI y COXII en ganglio dorsal y raíces, indicando una posible disminución de la actividad del C_{IV} de la CTE y un déficit en la OXPHOS (**Figura 34A**). La cantidad de ATPsintasa no se ve alterada (**Figura 34A**).

Observamos que el ratón YG8R muestra un aumento significativo de la enzima catalasa, sólo en el ganglio dorsal, y un ligero aumento de la enzima MnSOD en ganglio dorsal, raíces y cordones posteriores que indican una respuesta de los sistemas antioxidantes frente a una situación de estrés oxidativo. Esta situación de estrés oxidativo se confirmó con el oxyblot en el que se observa un aumento de las proteínas carboniladas sólo en las raíces nerviosas. El ganglio dorsal presenta una disminución de las proteínas carboniladas posiblemente porque el aumento de la catalasa consigue protegerlo frente al proceso de estrés oxidativo (**Figura 34B**).

El ratón YG8R presenta una sorprendente disminución significativa de los niveles de Cit c en las raíces nerviosas, indicando un posible fallo en la CTE y una disminución de la protección antioxidante del Cit c en el espacio intermembrana, que favorecen el proceso de estrés oxidativo que sólo sufren las raíces nerviosas (**Figura 34C**). El ratón YG8R presenta un aumento de la proteína Bcl-2 en ganglio, raíces y cordones posteriores indicando una protección frente a la apoptosis (**Figura 34C**), confirmándolo con la no detección de caspasa-3 activada en ninguno de los tejidos neuronales estudiados (datos no mostrados). El ratón YG8R no presenta aumento del LC3II, indicando que no presenta activación de la autofagia en ninguno de los tejidos neuronales estudiados (**Figura 34C**).

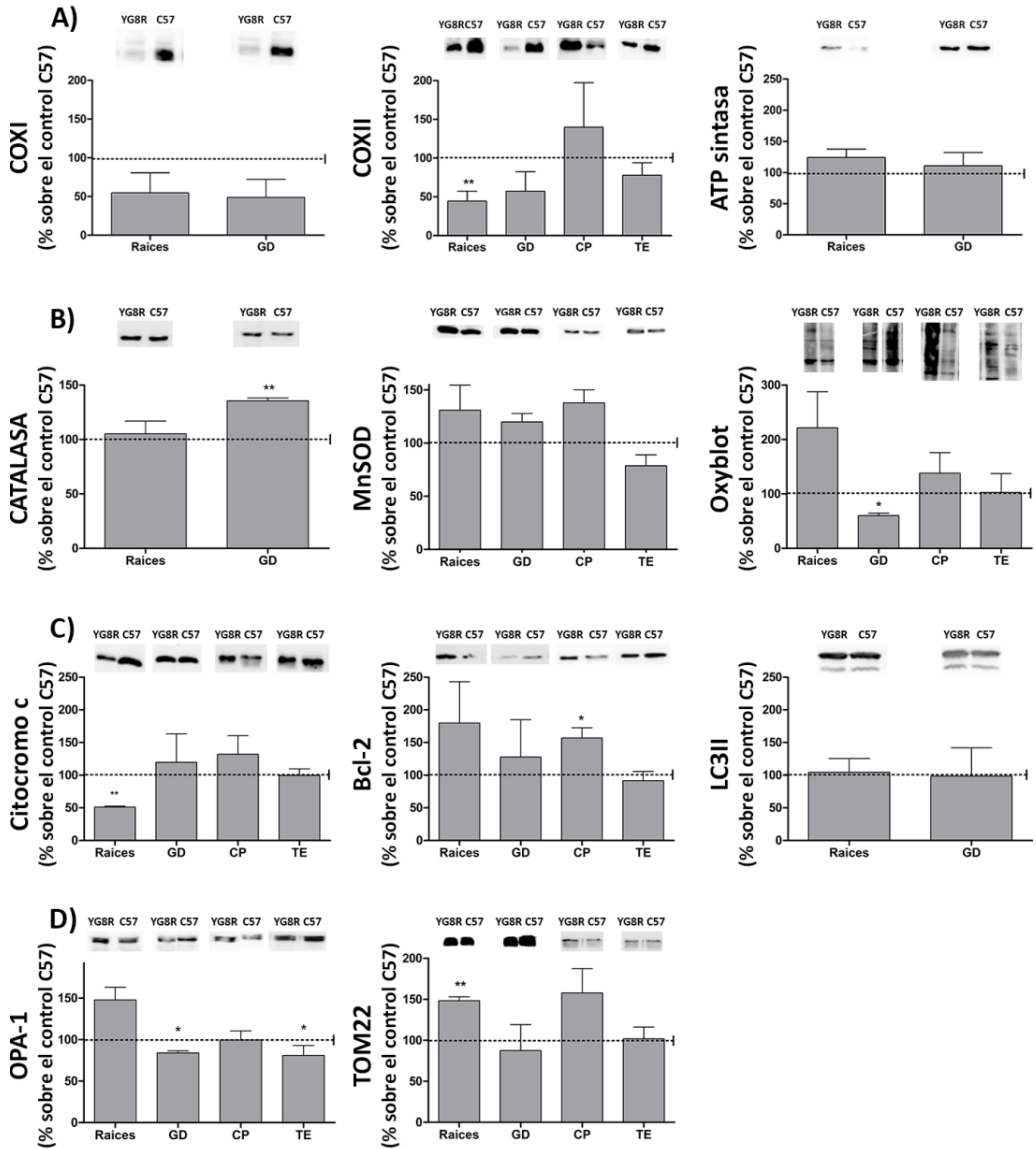


Figura 34. Estudio de las vías de neurodegeneración en tejidos neuronales del modelo murino FRDA.

Las gráficas muestran el porcentaje de expresión de las proteínas en el ratón YG8R respecto al control (línea discontinua representa el 100% del control C57BL/6J) en distintos tejidos neuronales (raíces nerviosas, GD, ganglio dorsal; CP, cordones posteriores y TE, tronco del encéfalo). Se acompaña de una imagen representativa de la inmunodetección por WB. (N=3-4). Análisis ANOVA unifactorial (genotipo) y nivel de significación * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

El ratón YG8R presenta un aumento de las proteínas mitocondriales TOM22 (MME) y OPA1 (MMI) indicando un aumento de la masa mitocondrial principalmente en las raíces nerviosas (**Figura 34D**). Este resultado determinó que aquellas proteínas donde se observó una disminución en el nivel de expresión en el ratón YG8R, no se debía a una reducción en el número de mitocondrias.

Los resultados revelan que el ratón YG8R sufre un proceso patológico en las raíces nerviosas, siendo menos evidente en el ganglio dorsal, columnas posteriores y tronco del encéfalo. La afectación axonal implica un fallo energético mitocondrial y un proceso de estrés oxidativo, con ausencia de apoptosis y de autofagia, que conlleva un aumento de la cantidad de masa mitocondrial como respuesta compensatoria a la disfunción mitocondrial. Un hecho sorprendente es que el ganglio dorsal, que contiene los somas de las neuronas sensitivas, parece estar compensando el estrés oxidativo. Este hecho podría explicar por qué no hemos encontrado signos patológicos en el estudio histológico del ganglio dorsal a ninguna edad, (datos no mostrados).

De forma muy interesante, el gradiente en la afectación de los tejidos neuronales se correlaciona inversamente con los niveles de frataxina que expresa cada tejido. La afectación neuronal se va diluyendo desde el SNP hacia el SNC de forma gradual conforme los niveles de frataxina aumentan, desde los menores niveles de frataxina en las raíces nerviosas hasta los mayores niveles en el tronco del encéfalo.

Los resultados sugieren que la expresión diferencial de frataxina favorece un proceso de neurodegeneración *dying-back* que implica al estrés oxidativo como mecanismo fisiopatológico. Y que la axonopatía distal, que presenta el ratón YG8R, puede ser un defecto primario en la fisiopatología de la FRDA siendo la degeneración del ganglio dorsal y de las columnas posteriores consecuencia de la neuropatía *dying-back* que se origina en las raíces periféricas del ganglio dorsal.

2.4. Fenotipado celular de las neuronas sensitivas del ganglio dorsal en cultivo primario

Después de caracterizar el fenotipo del modelo murino FRDA *in vivo* pasamos al estudio exhaustivo de las neuronas sensitivas en cultivo primario de ganglio dorsal *in vitro*.

El modelo de estudio fue el cultivo primario de ganglio dorsal de ratón adulto de 22-24 meses del modelo murino FRDA. Debido a la dependencia de la supervivencia y la funcionalidad de las neuronas sensitivas de su neurotrofina específica y a la confirmación de que las neuronas sensitivas adultas TrkC+ y TrkA+ *in vitro* incluso pueden activar la muerte neuronal en ausencia de ellas [53, 54], los cultivos primarios de ganglio dorsal adulto se suplementaron con las tres neurotrofinas esenciales NGF, BDNF y NT3. De esta forma se favoreció el crecimiento y la supervivencia de todas las poblaciones neuronales del ganglio dorsal adulto.

La observación, por contraste de fases, durante los 5 *div* del cultivo, indicó la presencia de una gran heterogeneidad de morfologías y tamaños de neuronas sensitivas y la presencia de células no neuronales en todos los genotipos del modelo murino FRDA. Los cultivos deficientes en frataxina crecieron de forma similar al control C57BL/6J, sin apreciarse cambios visibles entre ellos en la forma o la cantidad de neuronas o en la presencia de muerte neuronal.

2.4.1. La frataxina muestra una expresión mitocondrial correcta en la neurona sensitiva

El modelo murino FRDA es deficiente para la FXN murina y expresa una pequeña cantidad de FXN humana, por lo que quisimos estudiar su localización en las neuronas sensitiva de los ratones YG8R e YG8YG8R. Para ello se realizó la detección de FXN humana mediante IFI a los 5 *div* de un cultivo primario de ganglio dorsal de ratón adulto de 24 meses, previamente teñido con mitotracker.

Las imágenes de microscopía confirmaron que el control C57BL/6J no expresa FXN humana y que toda la proteína expresada en los ratones YG8R e YG8YG8R presentaba una localización mitocondrial (**Figura 35**). Se observa una mayor expresión en el soma neuronal debido a la mayor cantidad de mitocondrias que allí se localizan, pero también se detectó FXN humana en las mitocondrias dispuestas en la red neurítica.

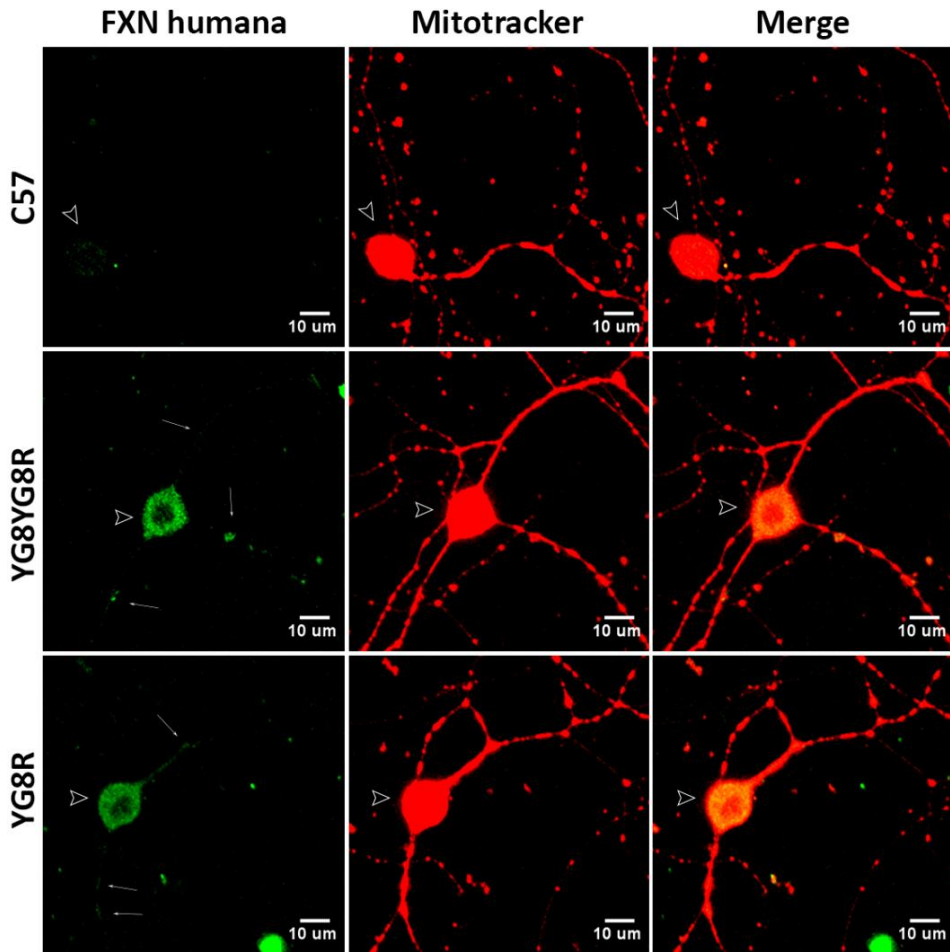


Figura 35. Detección de la FXN humana en el cultivo primario de neuronas sensitivas del ganglio dorsal en el modelo murino FRDA.

Las imágenes muestran el marcaje de la FXN humana en verde y la tinción de la mitocondria con mitotracker deep red en rojo. Los dos marcajes mitocondriales colocalizan en amarillo. Puede apreciarse que el control C57BL/6J no expresa FXN humana. Se observa una mayor cantidad de FXN humana en el ratón deficiente con dos copias del transgén YG8YG8R con respecto al ratón de una copia del transgén YG8R. Microscopía confocal a 63x, con aceite de inmersión. Las cabezas de flecha [∇] indican los somas neuronales y las flechas [↑] indican la presencia de frataxina en las mitocondrias en las neuritas.

Las neuronas sensitivas del modelo murino FRDA expresan una cantidad de FXN humana dependiente al número de copias del transgén YG8. Esta FXN humana corresponde a la isoforma clásica FXN1, que se procesa hasta la forma madura, localizándose correctamente en las mitocondrias del soma y de la red neurítica.

2.4.2. El déficit de frataxina provoca cambios morfológicos en los somas neuronales *in vivo*

Para conocer con más detalle las consecuencias del déficit de frataxina en las neuronas sensitivas se realizó el análisis morfométrico de los somas neuronales en cultivos primarios *in vivo* de ganglio dorsal de ratones de 24 meses de edad a 3 y 5 *div*. Los somas neuronales se clasificaron según el área en tres categorías: pequeñas ($\leq 300 \mu\text{m}^2$), intermedias ($300\text{-}500 \mu\text{m}^2$) y grandes ($> 500 \mu\text{m}^2$) [137]. Y según el diámetro en tres categorías: pequeñas ($\leq 20 \mu\text{m}$), intermedias ($21\text{-}28 \mu\text{m}$) y grandes ($>28 \mu\text{m}$) [138].

Primero analizamos la distribución de las áreas (**Figura 36A-B**), y los diámetros, (**Figura 37A-B**), y observamos un desplazamiento de las curvas hacia la izquierda de la gráfica indicando que los somas de las neuronas deficientes en frataxina YG8R e YG8YG8R presentan, a los 3 y 5 *div*, áreas y diámetros más pequeños que el control C57BL/6J. Esta disminución del tamaño es significativa en la distribución del área del YG8YG8R a los 5 *div* ($p=0.020^*$) y del diámetro del YG8YG8R a los 3 *div* ($p=0.0425^*$), respecto al control C57BL/6J.

Después analizamos la distribución de las áreas (**Figura 36C-D**), y los diámetros, (**Figura 37C-D**), separada por rangos de tamaño: observamos el aumento de los tamaños pequeños e intermedios y la disminución del tamaño más grande en el área y el diámetro de los somas neuronales deficientes en frataxina YG8R e YG8YG8R. Esta diferencia en la distribución de los tamaños es significativa en el diámetro y el área del ratón YG8R a los 3 *div* (chi-cuadrado 7959.2; $p=0.0187^*$ y chi-cuadrado 6818.2; $p=0.0331^*$) y en el área del YG8YG8R a los 3 y 5 *div* (chi-cuadrado 6048.2; $p=0.0486^*$ y chi-cuadrado 7172.2; $p=0.0277^*$).

Por último analizamos la media de las áreas (**Figura 36E-F**) y de los diámetros (**Figura 37E-F**) y observamos una ligera disminución del área media y del diámetro medio de los somas de las neuronas deficientes YG8R e YG8YG8R, sin ser estadísticamente significativo con respecto al control C57BL/6J.

El análisis morfométrico de los somas de las neuronas sensitivas del ganglio dorsal reveló que los ratones deficientes en frataxina presentan un tamaño de diámetro y de área que tiende a ser menor que el control C57BL/6J a los 3 y 5 *div*. El hecho de que las neuronas sensitivas presenten un tamaño menor en el ratón YG8R puede deberse al fallo energético asociado al déficit frataxina, y es coincidente con el menor diámetro de los somas neuronales que se presentan las neuronas del ganglio dorsal en biopsias de pacientes de FRDA [49]. Este retraso en el crecimiento es más evidente a los a los 3 *div*, sin embargo a los 5 *div* algunas neuronas alcanzan el tamaño del control C57BL/6J e incluso aparece una población con un diámetro y un área excesivamente más grandes que el control.

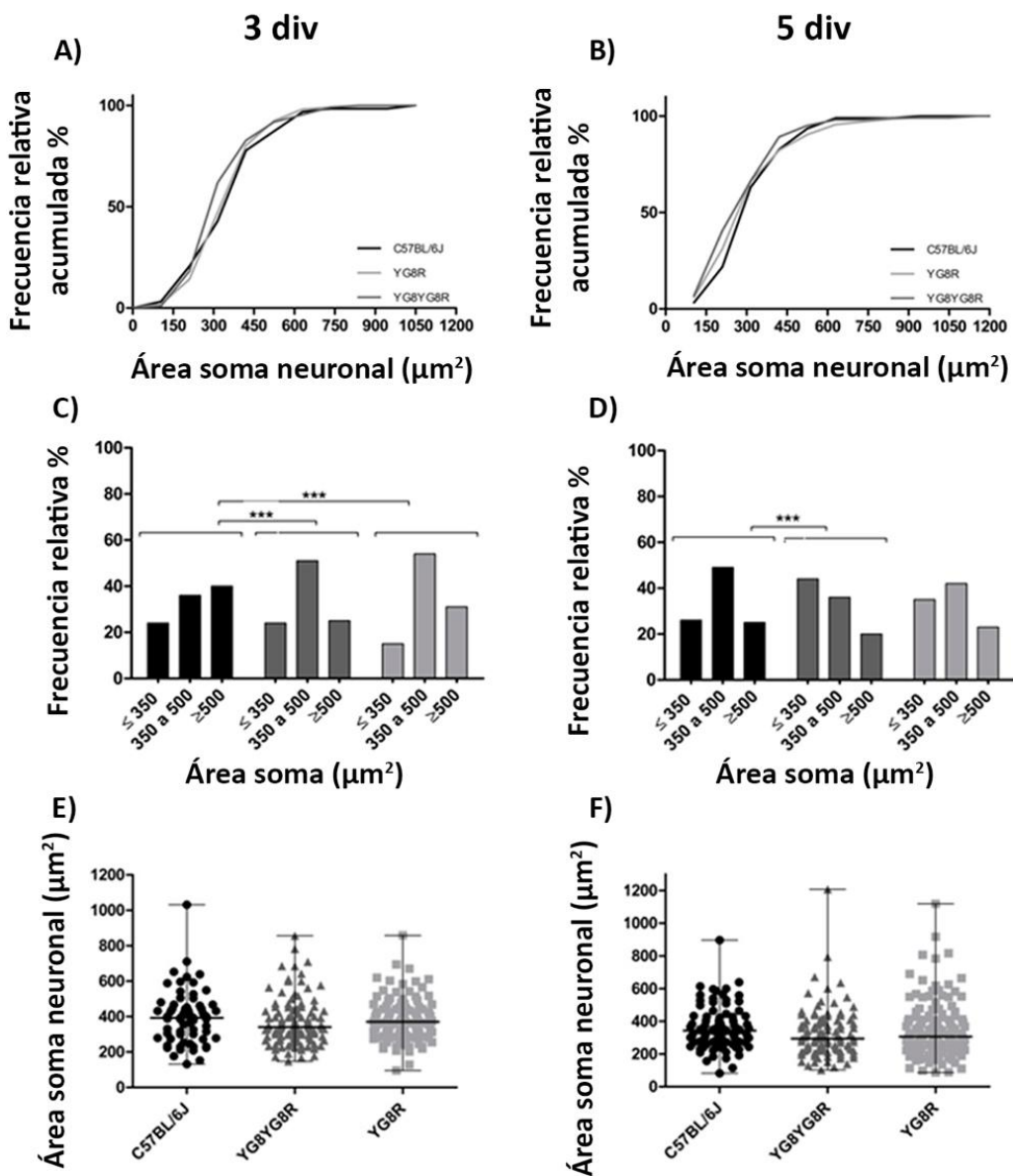


Figura 36. Frecuencia de tamaños de las áreas de los somas neuronales en el modelo murino FRDA.

Los histogramas muestran la comparación entre los genotipos de la distribución por área. **A, B** El histograma muestra la distribución de las áreas de los somas neuronales expresados en porcentaje de frecuencia relativa acumulada a 3 *div* (**A**) y 5 *div* (**B**). **C, D** El histograma muestra la distribución de las áreas expresados en porcentaje de frecuencia relativa en cada uno de los rangos de área determinados a 3 *div* (**C**) y 5 *div* (**D**). **E, F** La gráfica muestra la media del área con cada una de las medidas a 3 (**E**) y 5 *div* (**F**). Los datos representan las frecuencias y la media \pm SEM de 64, 111 y 107 neuronas y 92, 101 y 135 neuronas C57BL/6J, YG8YG8R y YG8R a 3 y 5 *div*, respectivamente. Análisis de Kolmogorov-Smirnoff para la frecuencia de distribución acumulada, tabla de contingencia y test exacto de Fisher para la frecuencia de distribución por rangos y análisis ANOVA univariante (genotipo) para la media y nivel de significación *** $p < 0.001$.

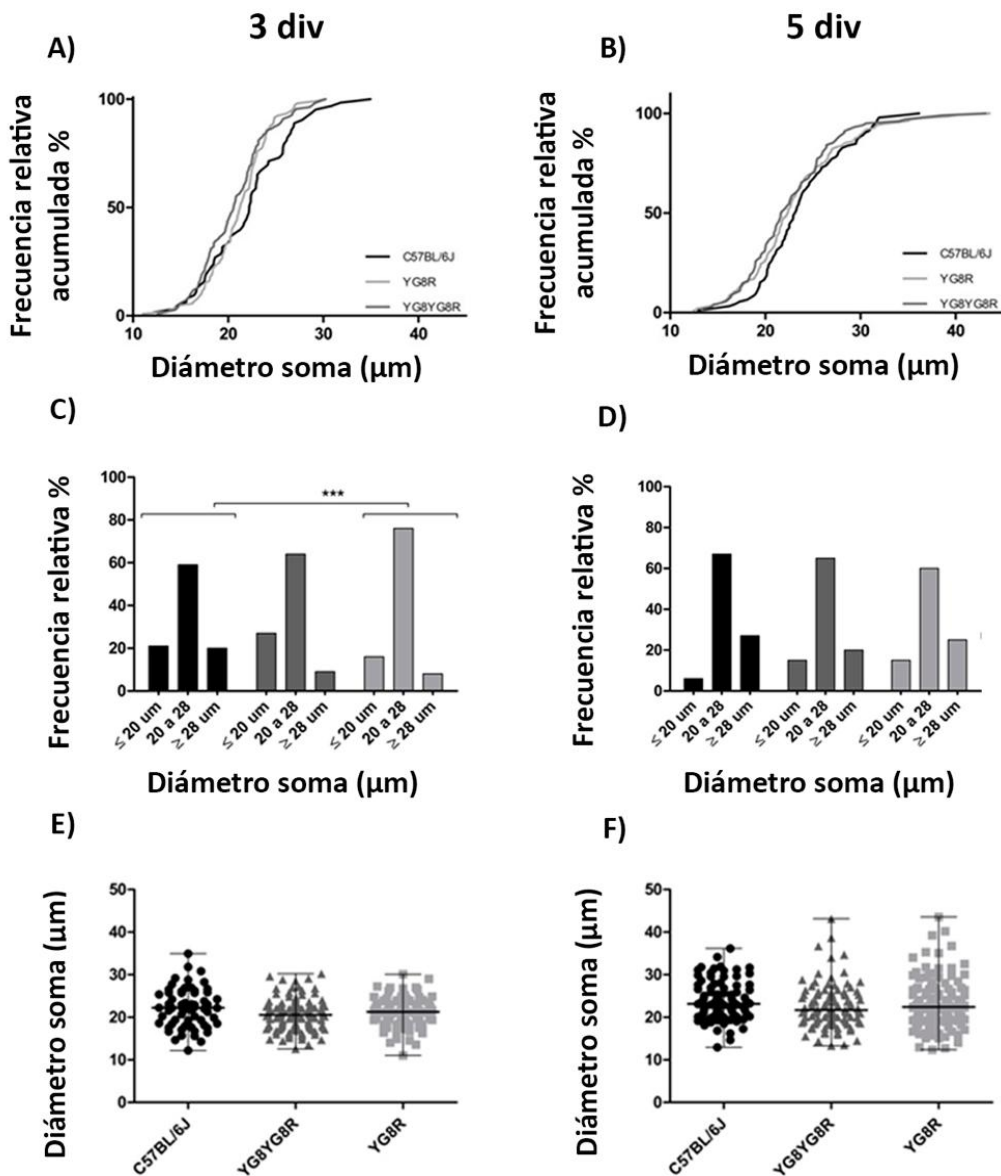


Figura 37. Frecuencia de tamaños de los diámetros de los somas neuronales en el modelo murino FRDA.

Los histogramas muestran la comparación entre los genotipos de la distribución por diámetro. **A, B)** El histograma muestra la distribución de los diámetros de los somas neuronales expresados en porcentaje de frecuencia relativa acumulada a 3 *div* (**A**) y 5 *div* (**B**). **C, D)** El histograma muestra la distribución de los diámetros expresadas en porcentaje de frecuencia relativa en cada uno de los rangos de diámetro determinados a 3 *div* (**C**) y 5 *div* (**D**). **E, F)** La gráfica muestra la media del diámetro con cada una de las medidas a 3 *div* (**E**) y 5 *div* (**F**). Los datos representan las frecuencias y la media \pm SEM de 64, 111 y 107 neuronas y 92, 101 y 135 neuronas C57BL/6J, YG8YG8R e YG8R a 3 y 5 *div*, respectivamente. Análisis de Kolmogorov-Smirnoff para la frecuencia de distribución acumulada, tabla de contingencia y test exacto de Fisher para la frecuencia de distribución por rangos y análisis ANOVA univariante (genotipo) para la media y nivel de significación *** $p < 0.001$.

2.4.3. El déficit de frataxina provoca distrofia axonal en las neuronas sensitivas

La frataxina se localiza en la matriz mitocondrial y su función más aceptada es su participación en la síntesis de los centros Fe-S. El déficit de frataxina causaría un defecto primario en la biosíntesis de centros Fe-S que provoca una gran número de fenotipos pleiotrópicos secundarios como la disfunción mitocondrial, el desequilibrio de la homeostasis del hierro, el daño del DNA y mutagénesis y el estrés oxidativo [48]. La disfunción mitocondrial se ha descrito en una multitud de modelos deficientes en frataxina como en levadura [30], *Drosophila* [16], *Caenorhabditis elegans* [15], línea celular neuroblastoma [18], ratón [14] y en células de pacientes de FRDA [17]. Por esta razón nos centramos en el estudio de la morfología y distribución de la mitocondria en la neurona sensitiva del cultivo primario de ganglio dorsal. El estudio mitocondrial se realizó en cultivo primario de ganglio dorsal de ratón de 24 meses de edad. A los 5 *div* se marcó la mitocondria con la sonda mitotracker deep red.

Las imágenes de microscopía revelaron que tanto la morfología como la distribución de la mitocondria a lo largo de las neuritas del ratón deficiente YG8R son anómalas (**Figura 38**). En las neuronas sensitivas del control C57BL/6J la estructura de la red mitocondrial se dispone mayoritariamente formando túbulos bien repartidos a lo largo de toda la red neurítica. Sin embargo, en el ratón YG8R la red mitocondrial pierde su estructura tubular y se presenta muy acumulada en zonas de la neurita en las que el axón aparece hinchado y/o formando esferoides axonales. En algunos casos estas acumulaciones se forman a lo largo de todo el proceso neurítico desde la zona proximal hasta la zona distal en forma de cadenas de esferas axonales, visibles a simple vista con microscopía transmitida. En el ratón C57BL/6J se observa, en general, una ausencia de la formación de esferoides axonales. Aunque en algún proceso neurítico puede encontrarse también la formación de pequeños esferoides axonales debido posiblemente a la edad avanzada elegida para el estudio.

La significación de estos esferoides axonales (10-50 μm) o varicosidades pequeñas (< 10 μm) implica un proceso de distrofia axonal, término utilizado en patología para definir los axones neuronales deformados, ampliamente descrito en las enfermedades neurodegenerativas del SNC y del SNP [68]. La formación de estos esferoides axonales es un claro marcador de daño axonal que se presenta en todos los tipos de mecanismos de degeneración axonal [139]. Por lo tanto, el ratón deficiente en frataxina YG8R presenta un proceso de distrofia axonal, con la formación de cadenas de esferoides axonales, en las que se acumula la mitocondria impidiendo su correcta distribución a lo largo de la neurita. La presencia de distrofia axonal y la distribución anómala de la mitocondria indican que las neuronas sensitivas deficientes en frataxina están sufriendo un proceso de neurodegeneración axonal.

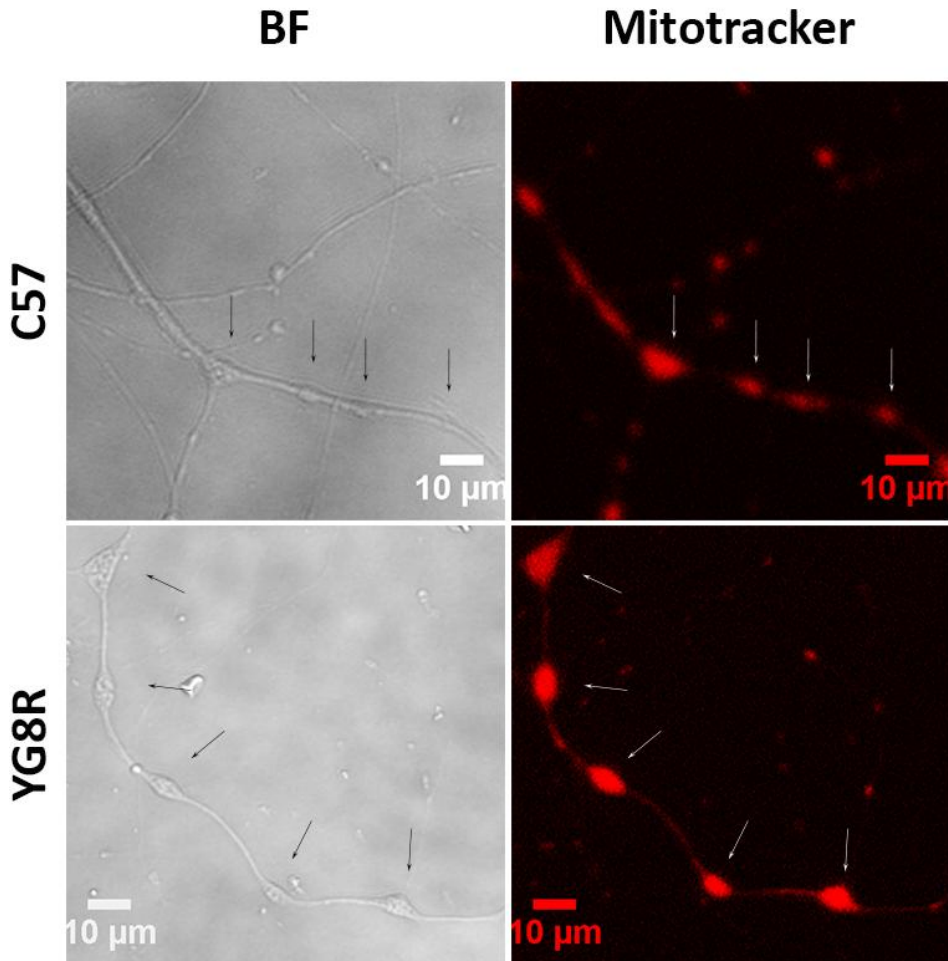


Figura 38. Detección de la distribución mitocondrial axonal en el modelo murino FRDA.

Las imágenes muestran la red neurítica en campo claro (BF) y la fluorescencia del marcaje mitocondrial con mitotracker deep en rojo. El control C57BL/6J presenta una red neurítica sin distrofia axonal y con una distribución mitocondrial normal. El ratón deficiente en frataxina YG8R presenta esferoides axonales y una distribución mitocondrial anómala. Microscopía confocal a 63x, con aceite de inmersión. Las flechas [↑] indican la distribución mitocondrial en las neuritas y la formación de esferoides axonales.

Quisimos averiguar qué población neuronal estaba sufriendo esta degeneración axonal que aparecía en el ratón deficiente YG8R. Para ello realizamos un cultivo primario de ganglio dorsal de ratón de 24 meses de edad y a los 5 *div* se marcó la mitocondria con la sonda mitotracker deep red y cada una de las poblaciones neuronales con un marcador específico mediante IFI. Para identificar la población nociceptiva se detectó su receptor TrkA y para identificar la población nociceptiva TrkA negativa se detectó un azúcar de la MP que se une específicamente a la isolectina IB4. Para identificar la población mecanorreceptiva se detectó su receptor de membrana TrkB y para la propioceptiva su proteína citosólica parvalbúmina.

Las imágenes de microscopía muestran la presencia de esferoides axonales en neuronas positivas para marcadores de neurona propioceptiva, nociceptiva TrkA+, nociceptiva TrkA- y mecanorreceptiva (**Figura 39**).

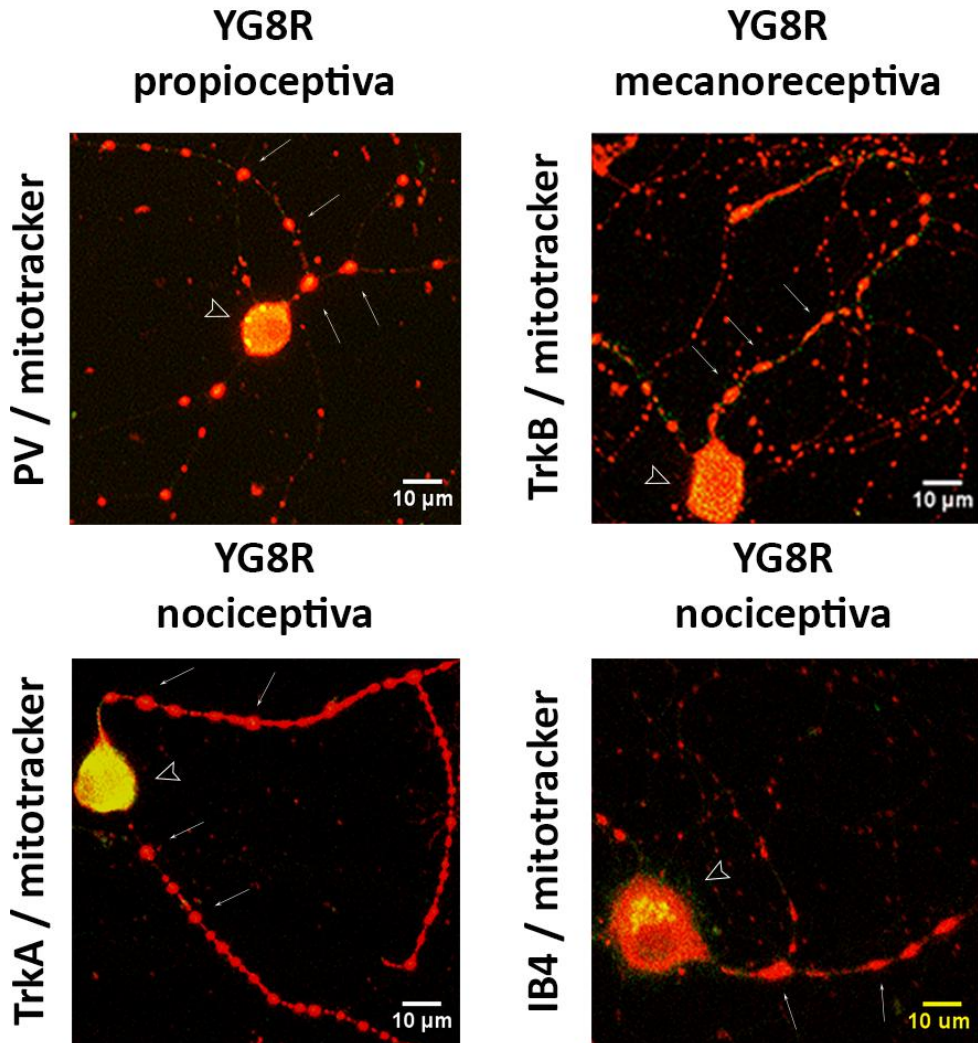


Figura 39. Identificación de los tipos de neuronas sensitivas con formación de esferoides axonales en el modelo murino FRDA.

Las imágenes muestran los montajes de la tinción de la mitocondria con mitotracker deep red en rojo y el marcaje del tipo neuronal en verde. Las neuronas en las que colocan los dos marcadores se observan de color amarillo. Se utilizó anti-PV como marcador específico de la población propioceptiva, anti-TrkA como marcador de neurona nociceptiva, anti-IB4 como marcador de neurona nociceptiva TrkA negativa, y anti-TrkB como marcador de neurona mecanorreceptiva. El ratón deficiente en frataxina YG8R presenta distrofia axonal en todos los tipos de neuronas sensitivas del cultivo primario de ganglio dorsal. Microscopía confocal a 63x, con aceite de inmersión. Las cabezas de flecha [↙] indican los somas neuronales y las flechas [↑] indican la retención de la mitocondria en los esferoides axonales en las neuritas.

Hemos podido confirmar que en el ratón deficiente en frataxina YG8R todas las poblaciones de neuronas sensitivas sufren un proceso de degeneración axonal. Por esta razón todos los estudios del fenotipado celular se realizaron en el conjunto completo de las neuronas del cultivo primario de ganglio dorsal, indistintamente del tipo sensitivo al que pertenecían.

Muchos autores han descrito que la distrofia axonal se caracteriza por presentar focos en los que se acumulan orgánulos y citoesqueleto desorganizado y son positivos para la proteína APP, implicando el bloqueo del transporte axonal en el daño neuronal [68, 139]. Por ello, quisimos estudiar si en la distrofia axonal que presentan las neuronas sensitivas deficientes en frataxina había presencia de estos marcadores. Para ello se realizó un amplio estudio con la detección de proteínas mitocondriales, proteínas del citoesqueleto y proteínas indicadoras del transporte axonal en el modelo murino FRDA.

2.4.3.1. El déficit de frataxina provoca una distribución anormal de la mitocondria a lo largo de las neuritas

Para confirmar la acumulación de mitocondria en los esferoideos axonales se realizó un cultivo primario de ganglio dorsal de ratón de 24 meses de edad. A los 5 *div* se marcó la mitocondria con la sonda mitotracker deep red y se detectaron varias proteínas mitocondriales mediante IFI, como son Cit c, OPA-1 y Bcl-2.

Las imágenes de microscopía revelaron que los tres marcadores mitocondriales, Cit c, OPA-1 y Bcl-2, colocalizan con la sonda mitotracker, indicando que no hay inespecificidad en la detección de la mitocondria (**Figura 40**). Observamos que en las neuronas sensitivas del control C57BL/6J la estructura de la red mitocondrial se dispone mayoritariamente formando túbulos bien repartidos a lo largo de toda la red neurítica. Sin embargo, en el ratón YG8R tanto la morfología como la distribución de la mitocondria a lo largo de las neuritas son anómalas y la mitocondria se presenta muy acumulada en los procesos neuríticos formando cadenas de esferoideos axonales. El estudio inmunocitoquímico con cuatro marcadores mitocondriales, confirmó la acumulación de la mitocondria a lo largo del axón en los esferoideos axonales, sugiriendo que el transporte mitocondrial a lo largo del axón está bloqueado, paralizado o impedido en los ratones deficientes en frataxina respecto al control C57BL/6J.

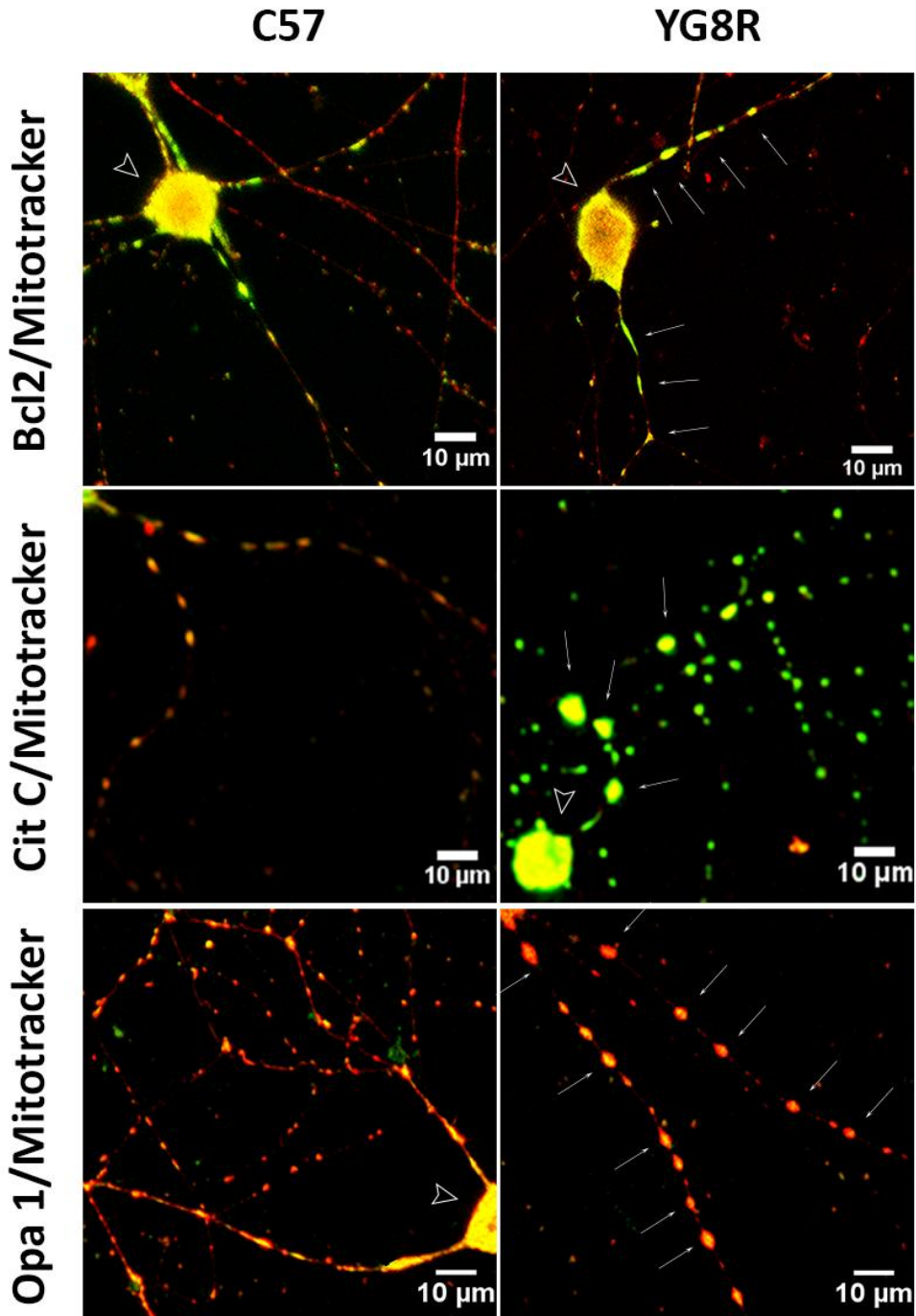


Figura 40. Detección de proteínas mitocondriales en los esferoides axonales en el modelo murino FRDA.

Se representa la tinción de la mitocondria con mitotracker deep red en rojo y el marcaje de proteínas mitocondriales en verde. Los dos marcajes mitocondriales colocalizan en amarillo. Se ha utilizado Bcl-2

como marcador de MME; OPA-1 como marcador de MMI; Cit c como marcador del espacio intermembrana. Se distinguen acumulaciones de mitocondria a lo largo de las redes neuríticas del ratón deficiente en frataxina YG8R con respecto al control C57BL/6J. Microscopía confocal a 63x, con aceite de inmersión. Las cabezas de flecha [∇] indican los somas neuronales y las flechas [↑] indican la retención de la mitocondria en los esferoides axonales en las neuritas.

La mitocondria es transportada de forma anterógrada a lo largo de los procesos neuronales para su correcta distribución en las regiones celulares de alta demanda metabólica y elevado Ca^{2+} intracelular, como las sinapsis y los nodos de Ranvier. El impedimento del movimiento y la incorrecta disposición mitocondrial a lo largo del axón tienen la capacidad de ser procesos fisiopatológicos altamente debilitantes que activan un círculo vicioso de daño neuronal y mitocondrial, que lleva a la degeneración axonal e incluso a la muerte neuronal [140]. Por lo que la acumulación anómala de la mitocondria a lo largo de las neuritas en las neuronas sensitivas del ratón YG8R sugiere un bloqueo del transporte mitocondrial que impediría la correcta localización de la mitocondria, pudiendo ser una de las causas que origina el proceso degenerativo en el déficit de frataxina.

2.4.3.2. El déficit de frataxina provoca alteraciones en el citoesqueleto

Para confirmar la acumulación de citoesqueleto en los esferoides axonales se realizó un cultivo primario de ganglio dorsal de ratón de 24 meses de edad. A los 5 *div* se marcó la mitocondria con la sonda mitotracker deep red y se detectaron varias proteínas del citoesqueleto mediante IFI, como son α -tubulina, β -tubulinIII (subunidad del microtúbulo específica de neurona), neurofilamento intermedio (NF160), neurofilamento pesado no fosforilado (SMI32), neurofilamento pesado fosforilado (RT97) y el filamento intermedio periferina (específico de neurona periférica).

Con respecto a los microtúbulos, las imágenes de microscopía confocal muestran que el control C57BL/6J presenta una estructura filamentosa de las proteínas del citoesqueleto que se dispone en paralelo a la neurita sin presencia de distrofia axonal y sin acumulación de la mitocondria (**Figura 41**).

Sin embargo el ratón YG8R presenta una α -tubulina acumulada formando parte de los esferoides axonales, con un marcaje general muy intenso que colocaliza con la acumulación de mitocondria en los focos de distrofia axonal. En el caso de la β -tubulina III, observamos en la imagen que el ratón YG8R la presenta muy acumulada formando parte de los esferoides axonales y colocalizando con la mitocondria retenida. Sin embargo en otras ocasiones no se ha detectado esta acumulación en los esferoides axonales, indicando que las alteraciones en la β -tubulina III pueden ser secundarias a la acumulación de la mitocondria.

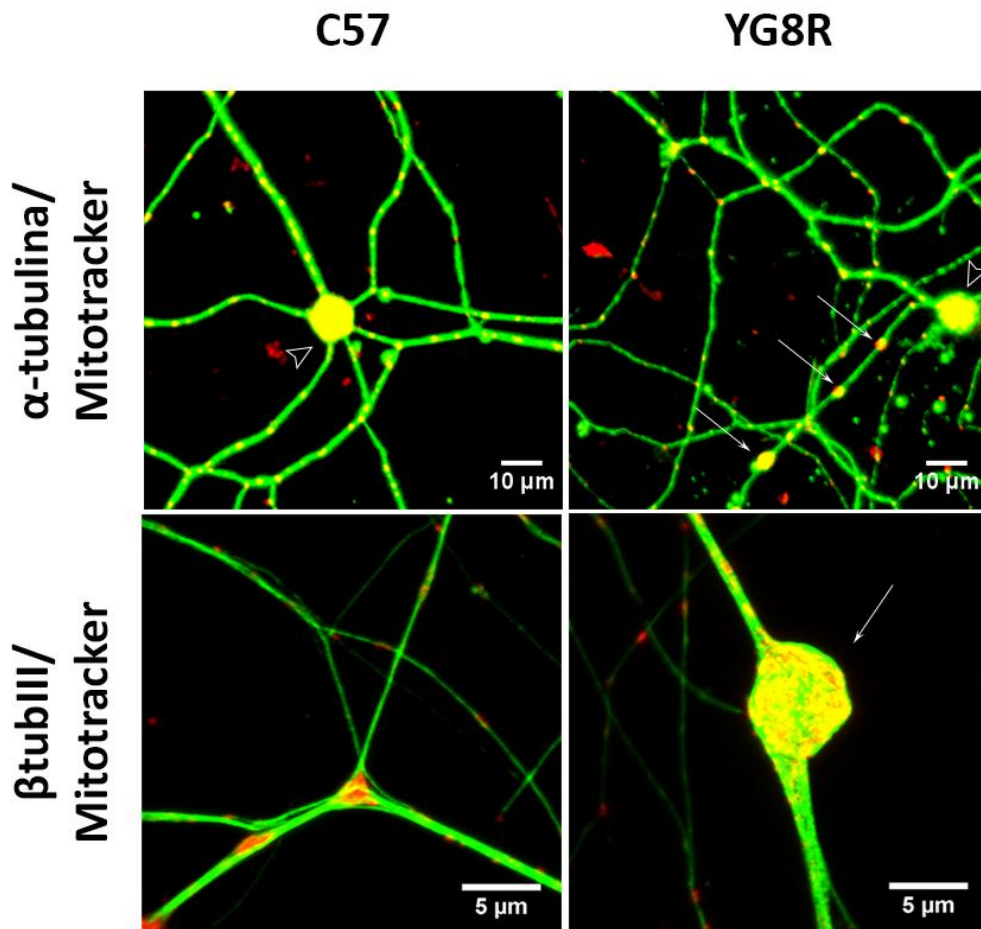


Figura 41. Detección de proteínas de microtúbulos en los esferoides axonales en el modelo murino FRDA.

Se representan los montajes de los canales de la tinción de la mitocondria con mitotracker deep red en rojo y el marcaje de proteínas del citoesqueleto en verde. Se ha utilizado α -tubulina y β -tubulina III como marcadores de microtúbulos. Se distinguen acumulaciones de mitocondria a lo largo de las redes neuríticas del ratón deficiente en frataxina YG8R con respecto al control C57BL/6J. Microscopía confocal a 63x, con aceite de inmersión. Las cabezas de flecha [∇] indican los somas neuronales y las flechas [\uparrow] indican la retención de la mitocondria y citoesqueleto en los esferoides axonales en las neuritas.

Con respecto a los neurofilamentos, el ratón YG8R presenta los tres neurofilamentos muy acumulados en los esferoides axonales, colocalizando con la mitocondria acumulada (**Figura 42**). Incluso en algunas ocasiones, como en el NF 160, la estructura filamentosa que forman desde la zona proximal del soma neuronal hasta la zona distal de las neuritas aparece rota o interrumpida a lo largo de los axones que presentan distrofia axonal, observándose una fragmentación axonal multifocal del citoesqueleto.

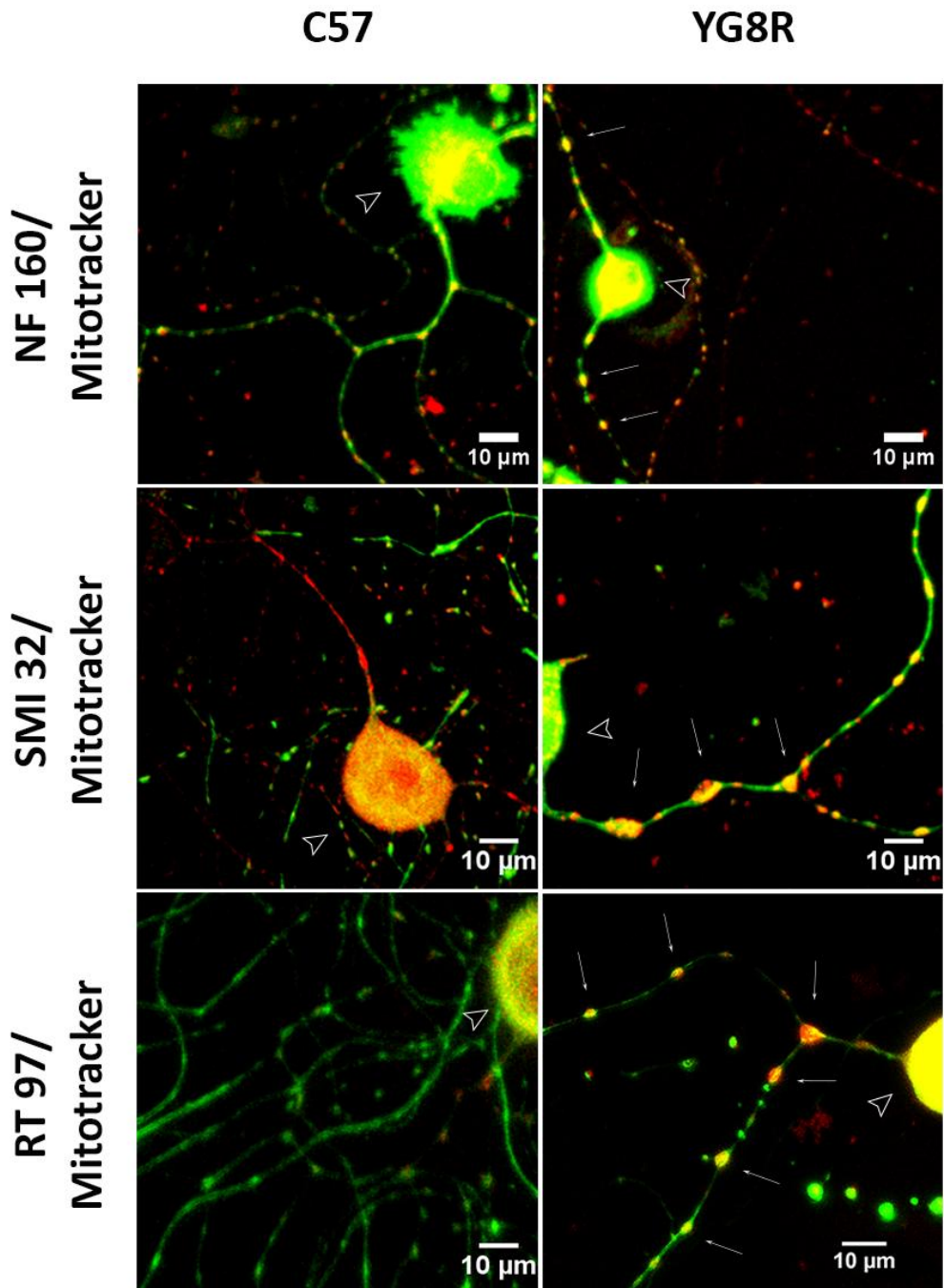


Figura 42. Detección de proteínas de neurofilamentos en los esferoides axonales en el modelo murino FRDA.

Se representan los montajes de los canales de la tinción de la mitocondria con mitotracker deep red en rojo y el marcaje de proteínas de neurofilamentos en verde. Se ha utilizado NF160, SMI32 y RT97 como marcadores de neurofilamentos. Se distinguen acumulaciones de mitocondria a lo largo de las redes

neuríticas del ratón deficiente en frataxina YG8R con respecto al control C57BL/6J. Se distingue la acumulación del citoesqueleto junto con la mitocondria en los esferoides axonales (SMI32, RT97) y la rotura de la estructura de neurofilamentos (NF160). Microscopía confocal a 63x, con aceite de inmersión. Las cabezas de flecha [∇] indican los somas neuronales y las flechas [↑] indican la retención de la mitocondria y citoesqueleto en los esferoides axonales en las neuritas.

Con respecto al filamento intermedio periferina, como le ocurre a la β -tubulinaIII, aparece a veces muy acumulada en los esferoides axonales junto con la mitocondria (datos no mostrados) y otras en niveles normales. En la **Figura 43** puede apreciarse la disposición longitudinal al axón de la periferina en el control C57BL/6J y cómo el YG8R se pierde la disposición longitudinal al axón y aparece desorganizada en los hinchazones del axón que pueden tener o no acumulación de mitocondria, sugiriendo que las alteraciones en el citoesqueleto pueden aparecer en etapas previas a la acumulación de la mitocondria.

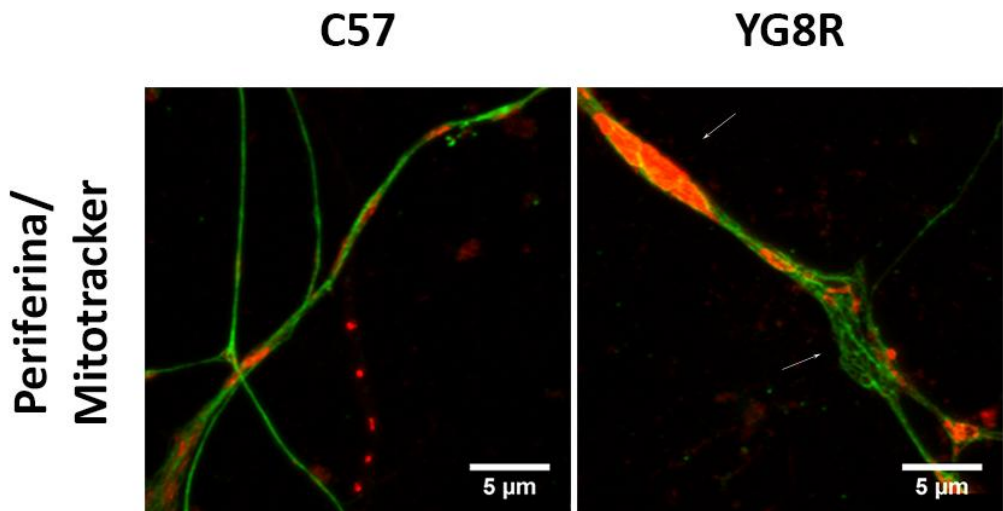


Figura 43. Detección de neurofilamento intermedio en los esferoides axonales en el modelo murino FRDA.

Se representan los montajes de los canales de la tinción de la mitocondria con mitotracker deep red en rojo y el marcaje de proteínas del citoesqueleto en verde. Se ha utilizado periferina como marcador de filamento intermedio. Se distinguen la hinchazón del axón, la pérdida de la organización en la estructura de la periferina y la gran acumulación mitocondrial a lo largo de la red neurítica del ratón deficiente en frataxina YG8R con respecto al control C57BL/6J. Microscopía confocal a 63x, con aceite de inmersión. Las flechas [↑] indican la retención de la mitocondria y los filamentos de periferina desorganizados en los esferoides axonales en las neuritas.

En su conjunto los resultados del estudio del citoesqueleto confirmaron que las neuronas sensitivas control presentan una estructura filamentosa de las proteínas del citoesqueleto, que se disponen en paralelo a la neurita sin presencia de distrofia axonal ni acumulación de mitocondrias. Sin embargo, en las neuronas deficientes en frataxina el citoesqueleto se acumula a lo largo del axón en los esferoides axonales.

Esta desorganización del citoesqueleto podría estar participando en la formación de los esferoides axonales. En ocasiones incluso el citoesqueleto puede llegar a sufrir fragmentación.

2.4.3.3. El déficit de frataxina provoca bloqueo del transporte axonal

Los microtúbulos de tubulina y actina son esenciales para generar y mantener la arquitectura del axón y constituyen las guías para el transporte de orgánulos en ambas direcciones a lo largo del axón. La afectación de los microtúbulos y de los eventos relacionados con los microtúbulos, como el transporte axonal, llevan a la degeneración axonal y se han descrito en enfermedades neurodegenerativas como paraplejia espástica hereditaria, tautopatías, ELA, Huntington y Parkinson [141].

El bloqueo del transporte mitocondrial y las alteraciones del citoesqueleto que se observan en las neuronas sensitivas del ganglio dorsal del ratón YG8R sugieren que el transporte axonal de otros orgánulos también puede estar afectado. Para confirmarlo se realizó un cultivo primario de ganglio dorsal de ratón de 24 meses de edad. A los 5 *div* se marcó la mitocondria con la sonda mitotracker deep red y se detectaron varios marcadores de transporte axonal rápido anterógrado de vesículas, como son β -APP y sinaptofisina, mediante IFI.

Las imágenes de microscopía muestran una gran acumulación de β -APP y sinaptofisina, que colocalizan con la mitocondria acumulada, en las neuronas sensitivas del ratón YG8R que presentaban esferoides axonales (**Figura 44**). Esta acumulación de las vesículas de transporte sugiere que el transporte axonal rápido está bloqueado, paralizado o impedido a lo largo del axón en las neuronas sensitivas deficientes en frataxina.

La acumulación de β -APP y sinaptofisina ha sido ampliamente descrita como indicativo del fallo en el transporte axonal anterógrado tras un daño axonal [68, 142, 143]. En algunos modelos se ha visto que el fallo en el transporte axonal puede ocurrir antes de la evidencia morfológica del daño axonal en forma de esferoides [144] y en otros se ha visto que ocurre después de originarse los sitios de acumulación mitocondrial y de proteínas estructurales, siendo los esferoides axonales los que permiten el bloqueo local del transporte axonal [145].

El transporte axonal rápido implica el movimiento de vesículas de transporte rápido y de la mitocondria desde el soma hacia la neurita y la terminación sináptica. Este transporte tiene una enorme relevancia para la función y el mantenimiento del axón y de la sinapsis neuronal por proveer de componentes esenciales recién sintetizados como enzimas, neurotransmisores y precursores de vesículas presinápticas, neuropéptidos y lípidos de membrana al axón y a la terminación sináptica. Los defectos en el transporte axonal rápido son suficientes para causar la pérdida de la función sináptica y la degeneración *dying-back* de los axones, que clásicamente se ha descrito como una degeneración de la zona distal de la neurona por déficit de aporte nutricional desde el soma neuronal [146].

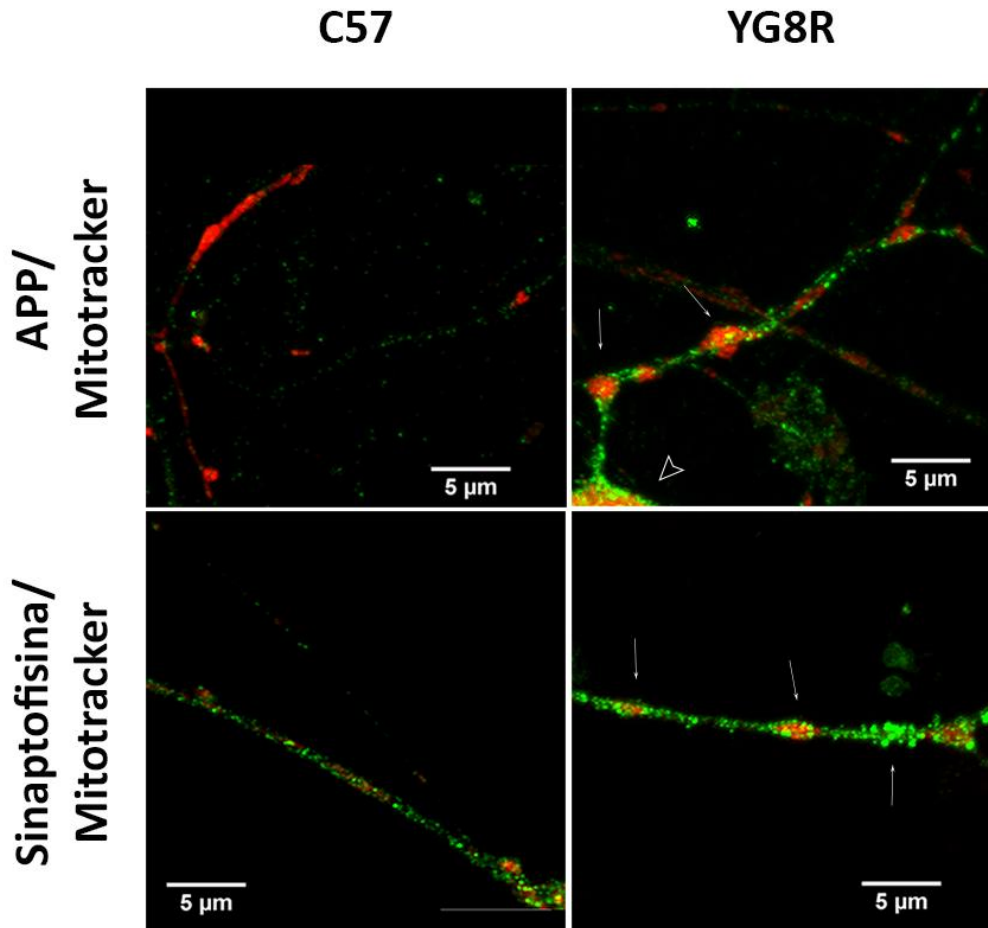


Figura 44. Detección de proteínas de vesículas de transporte en los esferoides axonales en el modelo murino FRDA.

Se representan los montajes de los canales de la tinción de la mitocondria con mitotracker deep red en rojo y el marcaje de proteínas de vesículas de transporte en verde. Se ha utilizado β -APP como marcador de vesículas de transporte rápido anterógrado y sinaptofisina como marcador de vesículas presinápticas. Se distinguen acumulaciones de vesículas de transporte a lo largo de las redes neuríticas del ratón deficiente en frataxina YG8R con respecto al control C57BL/6J. Microscopía confocal a 63x con aceite de inmersión. Las cabezas de flecha [∇] indican los somas neuronales y las flechas [\uparrow] indican la retención de la mitocondria y vesículas de transporte en los esferoides axonales en las neuritas.

Los resultados sugieren que las neuronas sensibles deficientes en frataxina están sufriendo un bloqueo del transporte mitocondrial y del transporte anterógrado rápido que impiden un adecuado aporte de mitocondria y de nutrientes desde el soma hacia el axón y a la terminación sináptica. Los resultados obtenidos, hasta el momento, no permiten concluir si la acumulación mitocondrial es la causa o la consecuencia del bloqueo del transporte axonal anterógrado rápido, pero sí permiten afirmar que esta situación anómala de la mitocondria y del transporte axonal pueden estar

favoreciendo el proceso de degeneración axonal *dying-back* en las neuronas sensitivas.

En un modelo murino deficiente de kinesina 1A (KIF5a), proteína motora, específica de neurona, implicada en el transporte anterógrado de vesículas y mitocondria, Xia y colaboradores (2003) observaron una acumulación de neurofilamentos y periferina en las neuronas del ganglio dorsal, relacionando el fallo del transporte axonal rápido anterógrado con el fallo del transporte axonal lento de los neurofilamentos. De igual forma en nuestro modelo FRDA, el fallo del transporte anterógrado rápido que presenta el YG8R podría estar participando en la acumulación de los neurofilamentos y la periferina en los esferoides axonales que presentan las neuronas sensitivas deficientes en frataxina por bloqueo del transporte axonal lento.

Toda esta afectación en el bloqueo del transporte axonal anterógrado de vesículas, mitocondria y citoesqueleto, que presentan las neuronas sensitivas deficientes en frataxina, hace sospechar que posiblemente el transporte axonal retrógrado también está impedido, como encontraron Shidara y Hollenbeck (2010) en un modelo *knockdown* de frataxina en *Drosophila*. En este modelo de FRDA los autores confirmaron la presencia de una neurodegeneración *dying-back* temprana durante el desarrollo que asociaron con una mitocondria despolarizada que se distribuye de forma anormal en la sinapsis y con fallo en el transporte axonal retrógrado [147].

Una afectación del transporte retrógrado tendría gran repercusión en dos procesos neuronales muy importantes para su supervivencia: la eliminación por autofagia de la mitocondria dañada y la asimilación de factores de crecimiento y sustancias tróficas endocitadas en la zona distal y transportadas al soma neuronal, como las neurotrofinas, para promocionar la supervivencia neuronal y modular la expresión génica [146]. El defecto en la disponibilidad de las neurotrofinas, debido a la afectación del transporte retrógrado, sería una posible causa del menor tamaño que presentan los somas de las neuronas sensitivas en el cultivo primario de ganglio dorsal, como vimos en el capítulo 2.4.2 de resultados.

2.4.3.4. El déficit de frataxina provoca un defecto en la autofagia

Se quiso estudiar si en la distrofia axonal de las neuronas sensitivas deficientes en frataxina se detectaba la presencia de marcadores autofágicos. Para ello se realizó un cultivo primario de ganglio dorsal de ratón de 24 meses de edad y a los 5 *div* se detectaron proteínas implicadas en el marcaje de la mitocondria para autofagia (p62), proteínas formadoras del fagosoma (LC3) y de lisosomas o autofagolisosoma (catepsina D y LAMP2) mediante IFI.

Las imágenes de microscopía muestran en las neuronas deficientes en frataxina YG8R un aumento del marcaje p62 que indica una acumulación de proteínas y mitocondrias ubiquitinadas y marcadas con p62 para su degradación por autofagia (**Figura 45**). También se observa menor presencia de vesículas con marcaje LC3, y la presencia de lisosomas, marcados con LAMP2 y catepsina D, acumulados en los esferoides axonales del ratón deficiente YG8R.

Los resultados sugieren que el déficit de frataxina provoca un defecto en el flujo autofágico debido a la acumulación de los intermediarios de la autofagia. La acumulación de proteínas y mitocondrias marcadas con p62, junto con la acumulación de lisosomas, detectados con el marcaje de LAMP2 y catepsina D, que observamos en los esferoides axonales, son un claro indicativo del fallo en el flujo autofágico y del transporte axonal en las neuronas deficientes en frataxina YG8R. Además este resultado confirma los hallazgos realizados en los tejidos neuronales del ratón YG8R en los que tampoco se detectó un aumento del LC3-II por WB (**Figura 34C** en el apartado 2.3.2 de resultados).

Los resultados confirman que las neuronas sensitivas deficientes en frataxina presentan un flujo autofágico incorrecto, con acumulación de intermediarios de la autofagia, asociado a un defecto en el transporte axonal. Este defecto en la autofagia provoca la acumulación de mitocondria y proteínas defectuosas que no son eliminadas y puede estar favoreciendo el proceso de neurodegeneración de las neuronas sensitivas YG8R.

Estudios previos de nuestro laboratorio en un modelo neuronal deficiente en frataxina en SHSY5Y demostraron un aumento de autofagia como mecanismo citoprotector frente a la disfunción mitocondrial y estrés oxidativo que intenta eliminar las mitocondrias defectuosas [18]. Sin embargo en las neuronas sensitivas deficientes en frataxina encontramos un defecto en el flujo autofágico, que además está favoreciendo el proceso neurodegenerativo. Esta diferencia puede ser debida a que en las neuronas sensitivas el proceso autofágico es mucho más complejo que en el modelo neuronal SHSY5Y, y hay que tener en consideración otros factores como el bloqueo del transporte axonal y la presencia de esferoides axonales, que pueden estar impidiendo la maduración y la dinámica del autofagosoma desde la zona distal a la zona proximal de las neuritas.

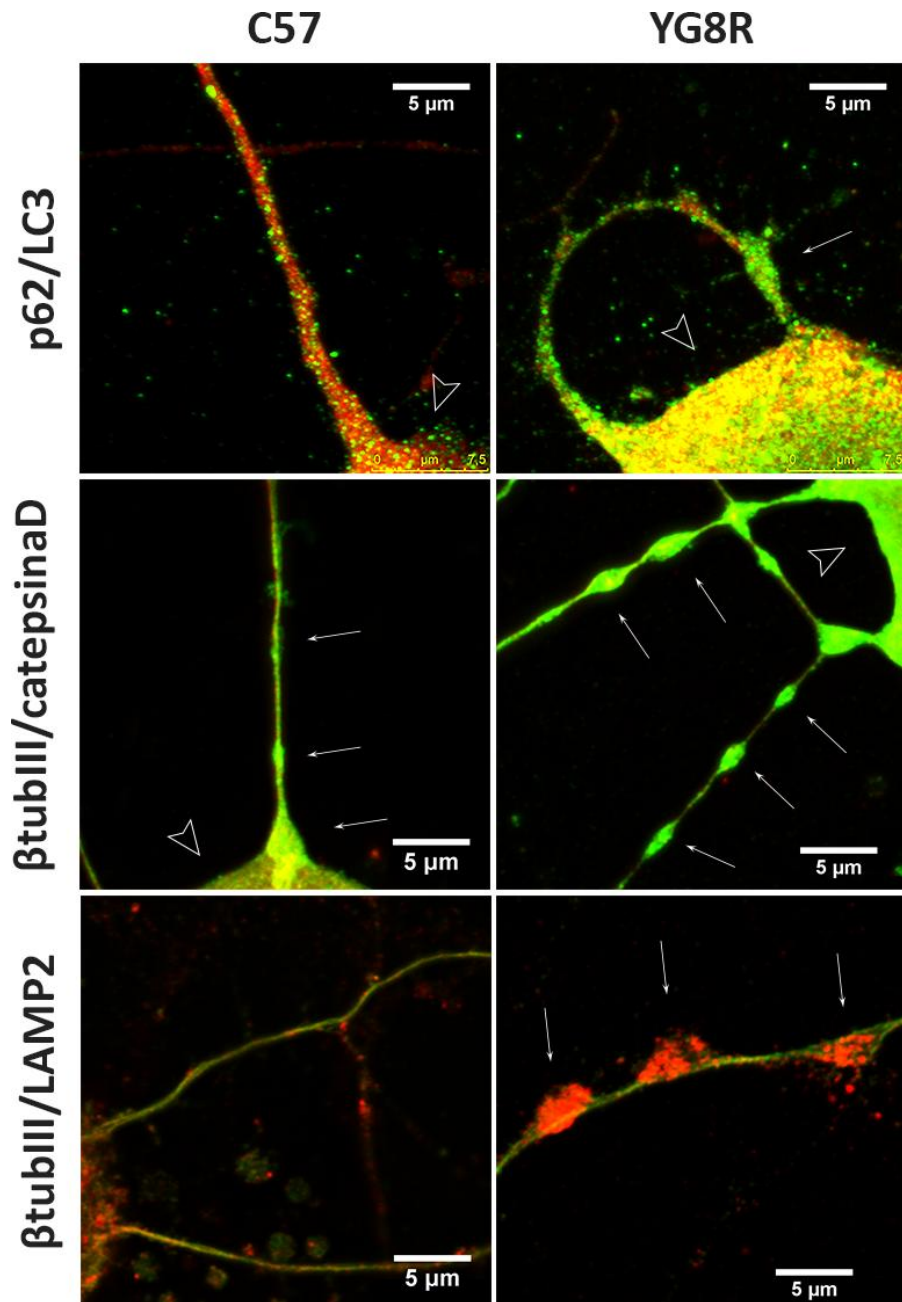


Figura 45. Detección de proteínas de autofagia en los esferoides axonales en el modelo murino FRDA.

Se representan los montajes de los canales del marcaje de las proteínas LC3, catepsina D o LAMP2 en rojo y p62 y β tubulina III en verde. Se distinguen acumulaciones de mitocondria marcada para autofagia con p62 en el ratón deficiente YG8R con respecto al control. Se distingue acumulación de catepsinaD y LAMP-2 en los esferoides axonales del ratón deficiente YG8R con respecto al control C57BL/6J. Microscopía confocal a 63x con aceite de inmersión. Las cabezas de flecha [↖] indican los somas neuronales y las flechas [↑] indican la retención de intermediarios de la autofagia en los esferoides axonales en las neuritas.

2.4.3.5. El déficit de frataxina provoca alteraciones en la ultraestructura de las neuronas sensitivas

Para conseguir más detalle sobre los efectos de la pérdida de frataxina en la biología celular de las neuronas investigamos la ultraestructura de la neurona y de los orgánulos celulares. Para ello se realizaron ensayos de microscopía electrónica, en cultivo primario de ganglio dorsal de 5 *div* de ratón de 24 meses de edad, que proveyeron una alta resolución de los hechos ultraestructurales del soma y la neurita. Las imágenes de microscopía electrónica muestran que el control C57BL/6J presenta en el soma neuronal un citoplasma rico en orgánulos, con prominentes poliribosomas, RE, una red de neurofilamentos organizada y una mitocondria con crestas bien definidas y con una distribución mitocondrial polarizada adecuada (**Figura 46A**). Debido a la edad de 24 meses el control C57BL/6J presenta algunas mitocondrias con pérdida de la estructura de las crestas mitocondriales y pequeños acúmulos de lipofucsina (**Figura 46C**). En la neurita proximal observamos una red del citoesqueleto rica, que se dispone longitudinalmente a la neurita, y la mitocondria es normal (**Figura 46E**).

En el ratón deficiente en frataxina YG8R observamos la presencia de grandes alteraciones en la ultraestructura del soma de las neuronas sensitivas, que incluyen la disolución del citoesqueleto, la presencia de mitocondria compactada y electrodensa, multitud de pequeñas y medianas vacuolas y grandes acúmulos de depósitos de lipofucsina (**Figura 46B**). La mitocondria se presenta muy hinchada con el contenido muy compactado (**Figura 46D**). Finalmente en los procesos neuríticos encontramos la presencia de hinchazones y esferoides axonales que contienen microtúbulos desorganizados y una gran acumulación de mitocondria alterada con aumento del tamaño mitocondrial y crestas desorganizadas (**Figura 46F**).

El análisis ultraestructural nos ha permitido confirmar la presencia de signos de neurodegeneración en las neuronas sensitivas deficientes en frataxina. Por primera vez se describe la ultraestructura de los frecuentes esferoides axonales encontrados, con acumulación de mitocondria distrófica y disolución del citoesqueleto, que coincide con la degeneración axonal del citoesqueleto descrito en los pacientes [3]. Además se observan otras lesiones clásicamente presentes en los pacientes de FRDA, como son abundantes vacuolas en los somas de neuronas sensitivas y grandes depósitos de lipofucsina, originados por el efecto oxidativo del hierro sobre proteínas lisosomales. En 2006 Al-Mahdawi y colaboradores describieron algunos de estos hallazgos ultraestructurales en el ratón deficiente YG8R a los 20 meses de edad, como vacuolas y depósitos de lipofucsina, y los relacionaron con el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial que sufren las neuronas propioceptivas del ganglio dorsal por el déficit de frataxina.

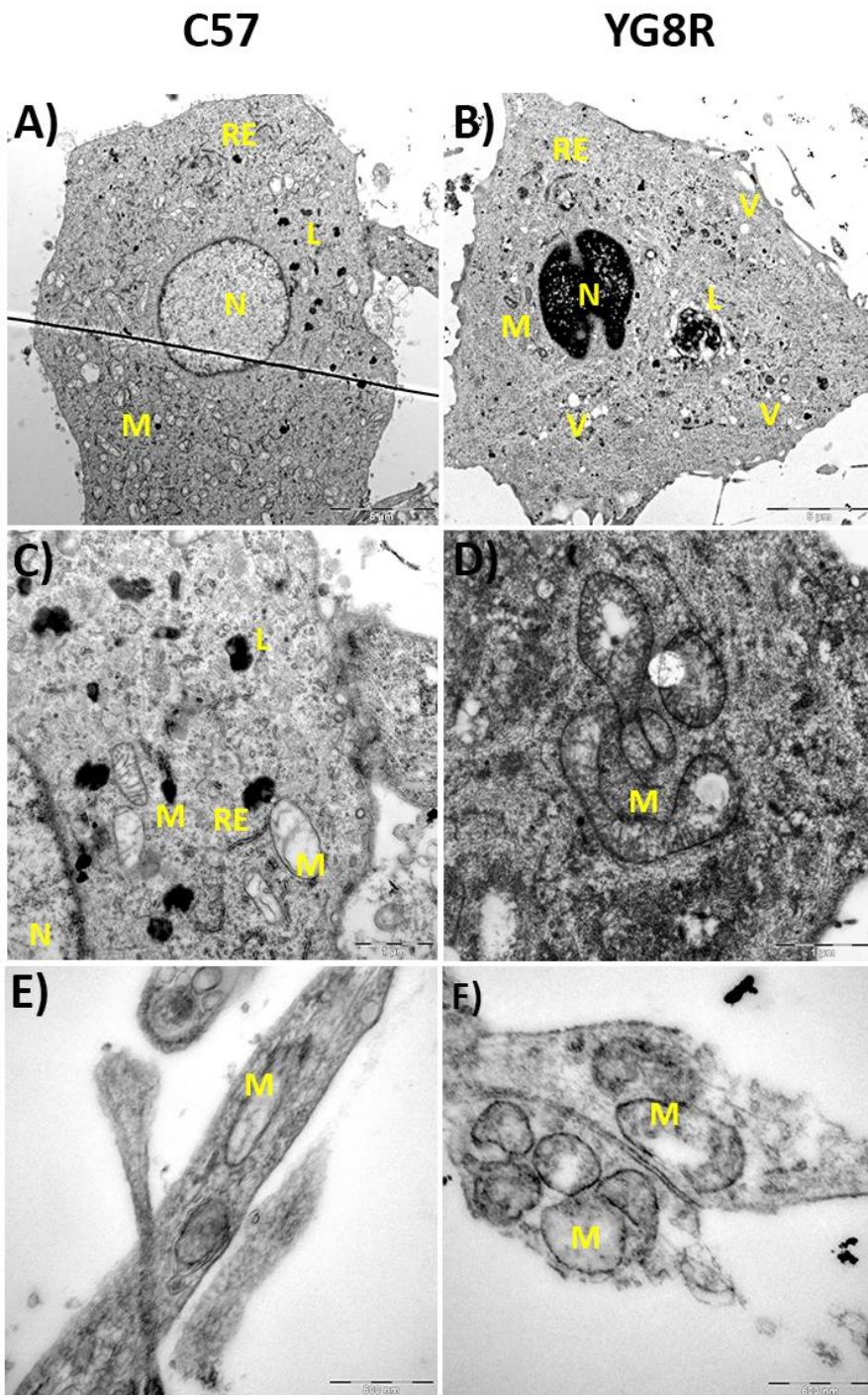


Figura 46. Ultraestructura de la neurona sensitiva en cultivo primario en el modelo murino FRDA. A-B) Microscopía electrónica a 1250x (escala 6 µm). C-D) 20500x (escala 1 µm). E-F) 43000x (escala 600 nm). En el ratón deficiente YG8R se aprecia el aumento de vacuolas y depósitos de lipofuscina, una

mitocondria hinchada con el contenido compactado y la presencia de esferoides axonales que acumulan mitocondria distrófica en las neuritas. N: núcleo; M: mitocondria; RE: retículo endoplásmico; L: acúmulos de lipofuscina; V: vacuolas.

2.4.4. El déficit de frataxina provoca una disfunción mitocondrial

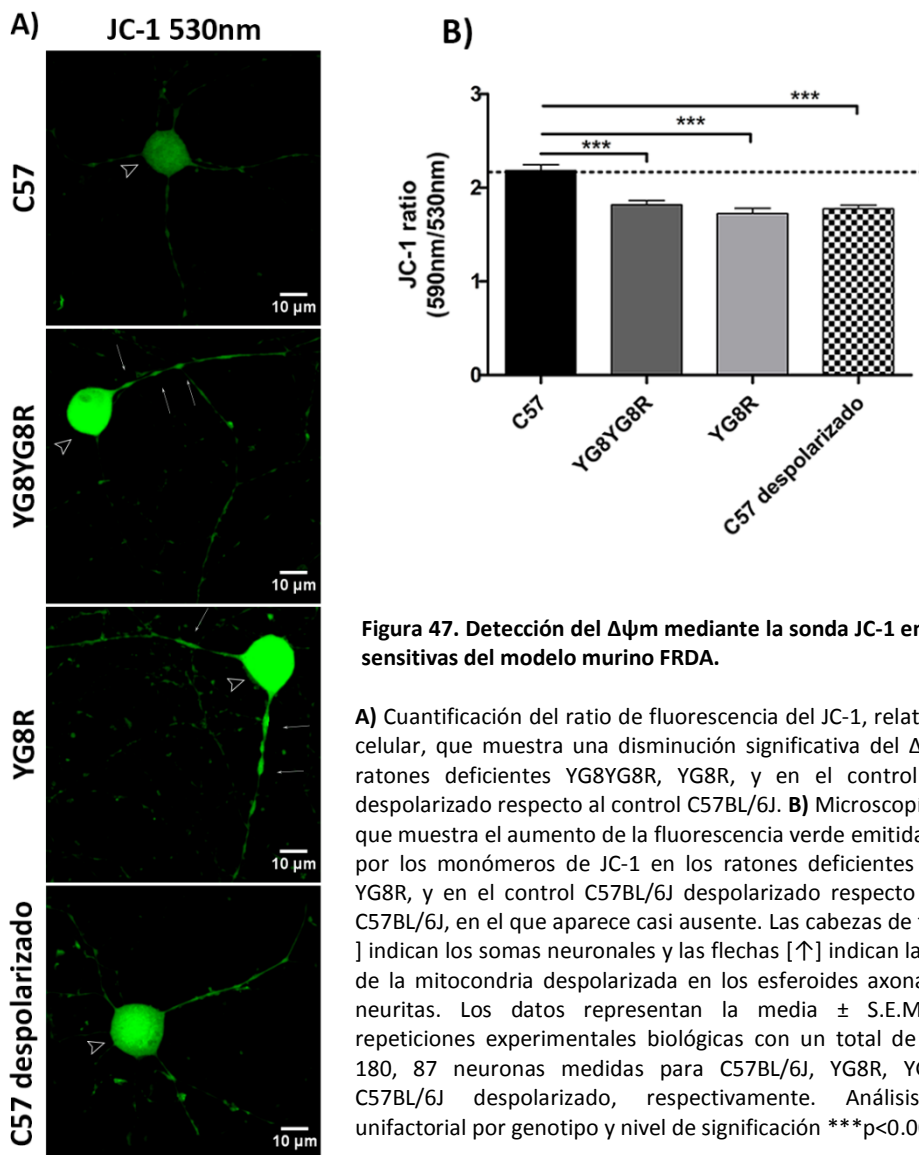
La amplia caracterización realizada del proceso de neurodegeneración axonal que sufren las neuronas sensitivas del modelo murino FRDA ha confirmado que la deficiencia de frataxina causa evidencias visibles de esferoides axonales, sugiriendo que el cultivo primario de ganglio dorsal aporta un modelo *in vivo* de la degeneración axonal muy útil para la investigación de los efectos celulares y subcelulares de la FRDA. Así pues, pasamos a estudiar la implicación de la función mitocondrial en el proceso patológico de degeneración. Para ello se estudió el $\Delta\psi_m$, la formación de ROS mitocondrial y la homeostasis del calcio en cultivo primario de ganglio dorsal de 5 *div* de ratones de 24 meses de edad en el modelo murino FRDA.

2.4.4.1. El déficit de frataxina causa una disipación del $\Delta\psi_m$ en la neurona sensitiva

El mantenimiento del $\Delta\psi_m$ es importante para que la mitocondria desempeñe correctamente sus funciones. Estudios previos de nuestro laboratorio confirmaron en la línea celular SHSY5Y que el déficit de frataxina afectaba al $\Delta\psi_m$ [18], por ello quisimos estudiarlo también en las neuronas sensitivas del modelo murino FRDA. La detección del $\Delta\psi_m$ se realizó por microscopía confocal utilizando la sonda fluorescente JC-1. Esta sonda es sensible al $\Delta\psi_m$, de forma que cuando la mitocondria está hiperpolarizada el JC-1 se agrega y emite fluorescencia roja a 590 nm y cuando la mitocondria está despolarizada permanece en forma de monómero JC-1 y emite fluorescencia verde a 530 nm. Calculando el ratio 590 nm / 530 nm de las dos fluorescencias podemos saber el estado del $\Delta\psi_m$. Como control positivo de despolarización mitocondrial se trataron las neuronas sensitivas del control C57BL/6J con una asociación de CCCP y oligomicina.

Las imágenes de microscopía muestran intensidades de fluorescencia del monómero JC-1 verde a 530 nm más elevadas en las neuronas deficientes YG8R, YG8YG8R y en las del control despolarizado (**Figura 47B**), que se traducen en una disminución del ratio 590 nm / 530 nm de forma significativa respecto al control C57BL/6J, e indican una disminución del $\Delta\psi_m$ (**Figura 47A**). El control C57BL/6J presenta una cantidad de mitocondria despolarizada detectable, debido posiblemente a la edad avanzada de 22-24 meses, pero vemos cómo en los ratones deficientes y en el control despolarizado la presencia de mitocondria despolarizada aumenta enormemente tanto en el soma neuronal como en la red neurítica (**Figura 47B**).

Este resultado confirma que el déficit de frataxina conlleva una despolarización de la membrana mitocondrial que favorece la disfunción mitocondrial y el fallo energético y puede estar favoreciendo el daño axonal, debido a la acumulación de mitocondria despolarizada que se observa en los esferoides axonales (**Figura 47B**).



2.4.4.2. El déficit de frataxina causa un aumento del estrés oxidativo.

El estrés oxidativo está ampliamente descrito en la FRDA, tanto en muestras de orina y plasma de pacientes [12, 13], como en diferentes modelos deficientes en frataxina de *C.elegans*, *Drosophila* y líneas celulares como neuroblastoma [14-17]. Por esta razón quisimos averiguar si también estaba presente en las neuronas sensitivas del modelo murino FRDA. Para detectarlo utilizamos la sonda MitoSOX que emite fluorescencia roja al oxidarse por la presencia de $O_2^{\bullet-}$. También se incluyeron en el estudio un control positivo de estrés oxidativo y un control positivo de despolarización mitocondrial, para ello se trataron las neuronas sensitivas del control C57BL/6J con H_2O_2 y con CCCP-oligomicina, respectivamente.

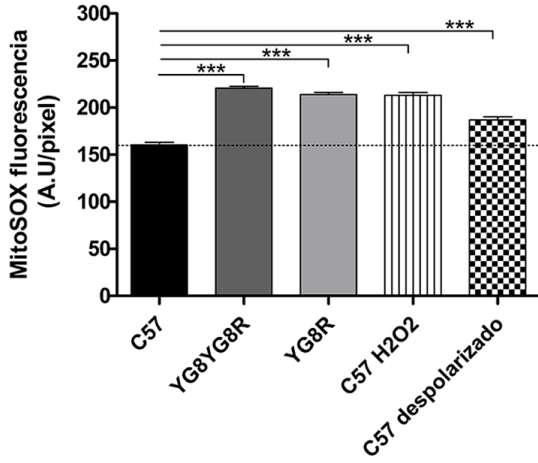
Las imágenes de microscopía muestran intensidades de fluorescencia del MitoSOX más elevadas en las neuronas deficientes YG8R e YG8YG8R (**Figura 48B**) y en el control oxidado con H_2O_2 y el control despolarizado con CCCP-oligomicina (**Figura 48C**) estadísticamente significativas con respecto al control C57BL/6J (**Figura 48A**) que indican un aumento de estrés oxidativo. En la imagen de microscopía vemos que el control C57BL/6J presenta $O_2^{\bullet-}$ detectable en el soma neuronal debido a la gran cantidad de mitocondria que allí se localiza y posiblemente a la edad avanzada de 22-24 meses. En los ratones deficientes en frataxina y en los controles oxidado y despolarizado la presencia de $O_2^{\bullet-}$ aumenta enormemente tanto en el soma neuronal como en la red neurítica, apreciándose un aumento del $O_2^{\bullet-}$ en los esferoides axonales (**Figura 48B y 47C**) sugiriendo que el estrés oxidativo puede estar favoreciendo el daño axonal. Debido a la presencia de esferoides axonales en las neuronas sensitivas del control C57BL/6J tratadas con H_2O_2 y CCCP-oligomicina podemos afirmar que tanto el estrés oxidativo como la despolarización mitocondrial están directamente implicados en la formación de esferoides axonales (**Figura 48C**).

Por lo tanto, la detección del $O_2^{\bullet-}$ en las neuronas sensitivas de ganglio dorsal del modelo murino FRDA ha confirmado que el déficit de frataxina aumenta la producción de $O_2^{\bullet-}$, indicando que las neuronas sensitivas sufren un proceso de estrés oxidativo en el soma y en la red neurítica que favorece la formación de los esferoides axonales y en el que también participa la despolarización mitocondrial.

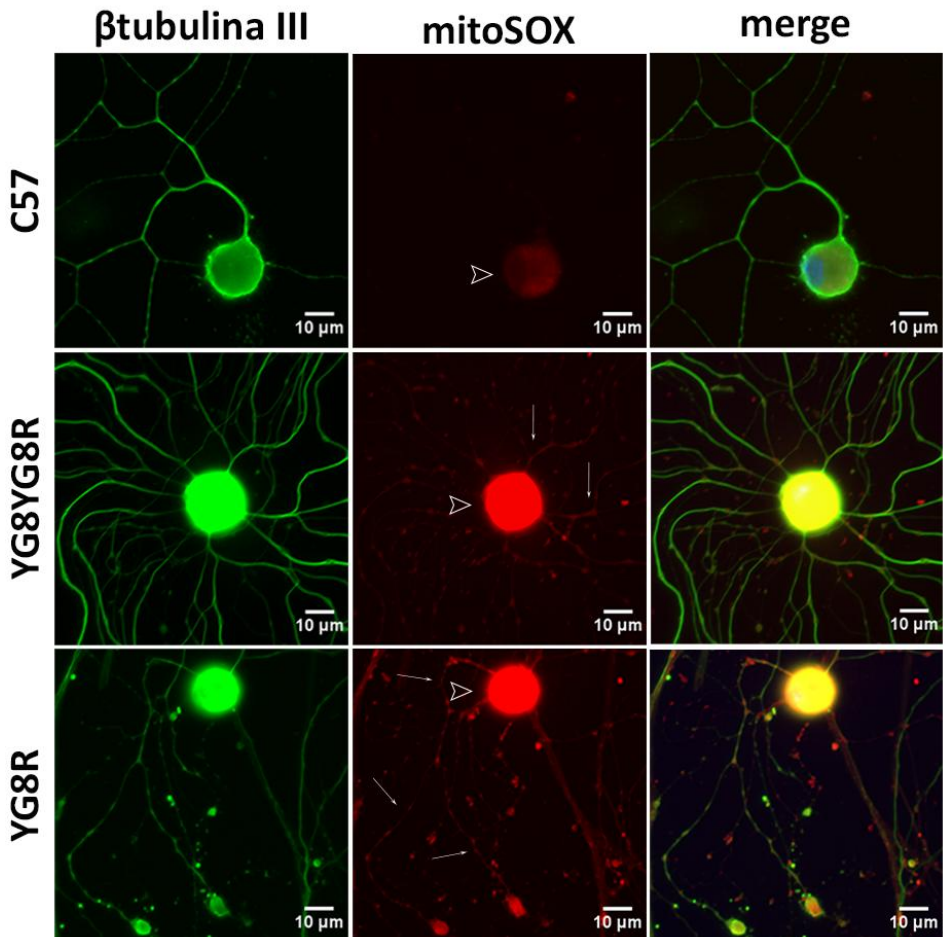
La despolarización mitocondrial y el estrés oxidativo están presentes en muchas enfermedades neurodegenerativas como Parkinson, Alzheimer, ELA, y por supuesto en la FRDA, y se han relacionado con la formación de estructuras axonales aberrantes y con defectos en el transporte axonal en estas enfermedades neurodegenerativas [140, 148].

Así pues, nuestros resultados sugieren que tanto el estrés oxidativo como la despolarización mitocondrial que sufren las neuronas sensitivas deficientes en frataxina están implicados en la formación de la distrofia axonal, en la parada del transporte mitocondrial y del transporte axonal general que presentan las neuronas sensitivas deficientes en frataxina.

A)



B)



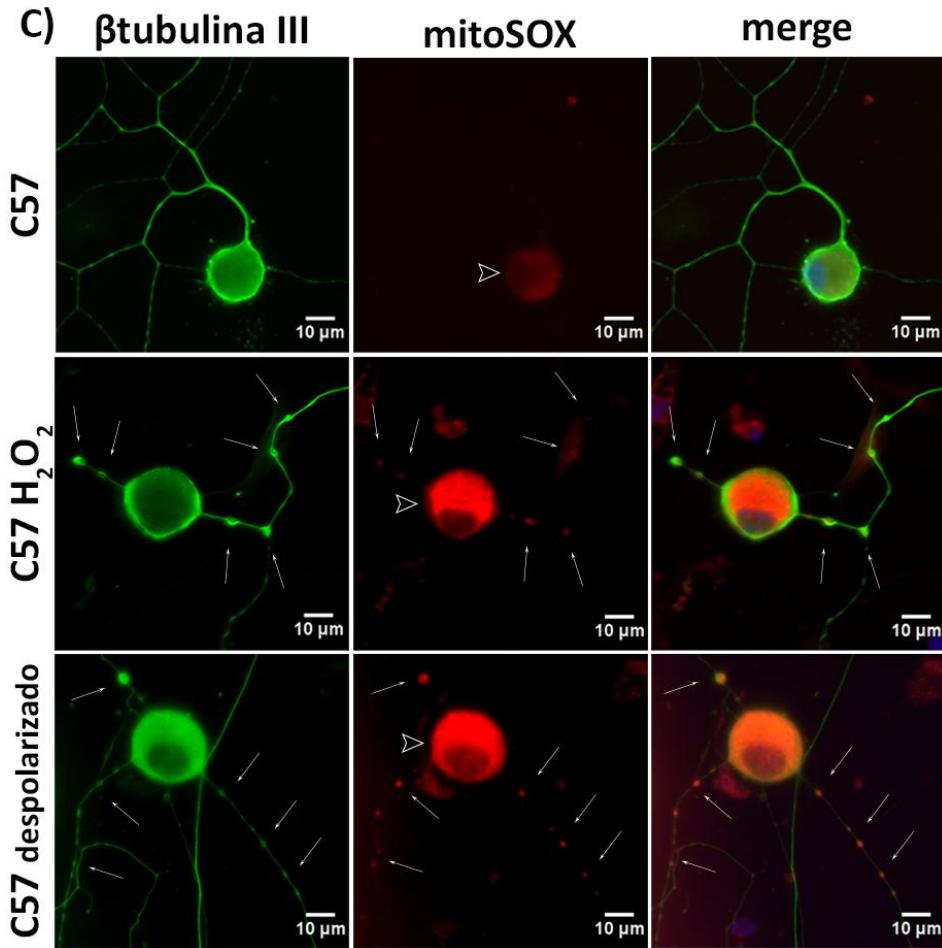


Figura 48. Detección del $O_2^{\bullet-}$ mediante la sonda MitoSOX en neuronas sensitivas del modelo murino FRDA.

A) Cuantificación del nivel de fluorescencia roja emitida por la sonda MitoSOX oxidada en presencia de $O_2^{\bullet-}$ mitocondrial relativa al área celular. Los resultados muestran un aumento significativo de la producción de $O_2^{\bullet-}$ en las neuronas sensitivas de YG8YG8R, YG8R, en el control oxidado y en el control despolarizado respecto al control C57BL/6J. **B,C)** Las imágenes de microscopía muestran una fluorescencia roja casi ausente en el control C57BL/6J que aumenta en los ratones deficientes en frataxina (**B**) y en los controles oxidado y despolarizado (**C**). En verde se muestra la tinción con β -tubulinaIII, marcador de neurona. Las cabezas de flecha [∇] indican los somas neuronales y las flechas [\uparrow] indican los esferoides axonales con producción de $O_2^{\bullet-}$ en las neuritas. Los datos representan la media \pm S.E.M de tres repeticiones experimentales biológicas con un total de 712, 236, 256, 365 y 287 neuronas medidas para C57BL/6J, YG8R, YG8YG8R, control oxidado y control despolarizado, respectivamente. Análisis ANOVA unifactorial por genotipo y nivel de significación *** $p < 0.001$.

2.4.4.3. El déficit de frataxina causa un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ y una disminución del mecanismo de SOCE

La despolarización mitocondrial y el aumento del estrés oxidativo que presentan las neuronas sensitivas deficientes en frataxina son situaciones anómalas muy relacionadas con la homeostasis del calcio celular. Estudios previos en nuestro laboratorio en la línea celular SHSY5Y confirmaron que el déficit de frataxina afectaba la homeostasis del calcio [18]. Por todo ello quisimos comprobar si las neuronas sensitivas del modelo murino FRDA presentaban alteraciones en la homeostasis del calcio. Para ello utilizamos la sonda Fura-2 AM que permanece en el citosol y permite detectar cambios en los niveles del Ca^{2+} citosólico. La inducción del cultivo primario de ganglio dorsal, en medio libre de Ca^{2+} , con diferentes compuestos que provocan un aumento de la concentración de Ca^{2+} citosólico, $[Ca^{2+}]_i$, permitió el estudio de la capacidad tamponadora de la mitocondria y del mecanismo del SOCE. En el estudio se incluyó un control positivo de despolarización mitocondrial, para ello se trataron las neuronas sensitivas del control C57BL/6J con CCCP-oligomicina. El análisis de las medidas de calcio de una misma neurona se ha realizado por separado en el soma neuronal y en la red neurítica.

El tBuBHQ es un inhibidor de la bomba SERCA del RE, impide la entrada de Ca^{2+} al RE, por lo que el RE acaba vaciándose rápidamente y se produce un aumento de $[Ca^{2+}]_i$. Ante este incremento la neurona debe responder, con sus mecanismos tamponadores, para restablecer los niveles de Ca^{2+} citosólicos. Por otra parte el vaciado del RE activa la entrada de Ca^{2+} a través de los canales SOC de la MP en un proceso global llamado SOCE. Si el mecanismo del SOCE funciona correctamente la adición de un exceso de $CaCl_2$ al medio extracelular permite la entrada del Ca^{2+} a través de los canales SOC que provoca la elevación de $[Ca^{2+}]_i$.

Los resultados muestran que, en ausencia de Ca^{2+} extracelular, las neuronas sensitivas deficientes en frataxina y el control despolarizado presentan $[Ca^{2+}]_i$ basales más altas en el soma (**Figura 49B y 49D**) y en la red neurítica (**Figura 49F y 49H**). Estos resultados sugieren que la despolarización mitocondrial que presentan los ratones deficientes en frataxina está provocando un moderado aumento del nivel basal de $[Ca^{2+}]_i$ mantenido en el tiempo.

Tras la adición del tBuBHQ observamos la depleción de los almacenes de RE que provocan el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ y la respuesta de la neurona para intentar restablecerlos. Los resultados muestran que las neuronas sensitivas deficientes en frataxina muestran un retraso en la restauración de los niveles del Ca^{2+} citosólico con respecto al control C57BL/6J en el soma (**Figura 49B**). Este resultado sugiere que el proceso de tamponamiento del Ca^{2+} intracelular de las neuronas deficientes en frataxina está impedido. Inesperadamente el axón no muestra capacidad de respuesta tamponadora del Ca^{2+} en ninguno de los genotipos, ni siquiera en el control C57BL/6J (**Figura 49F**).

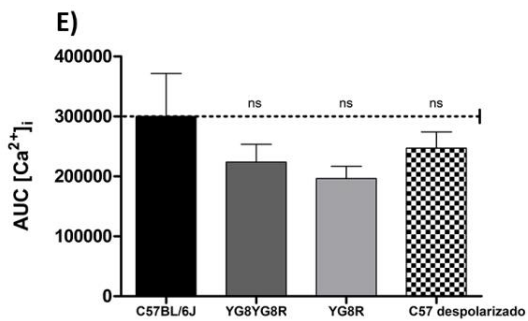
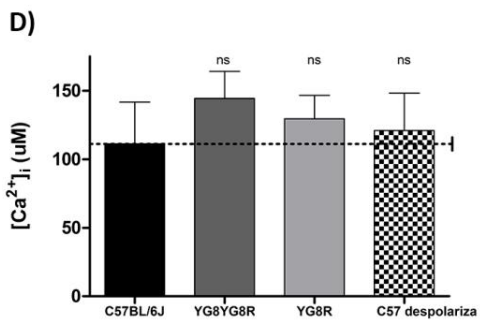
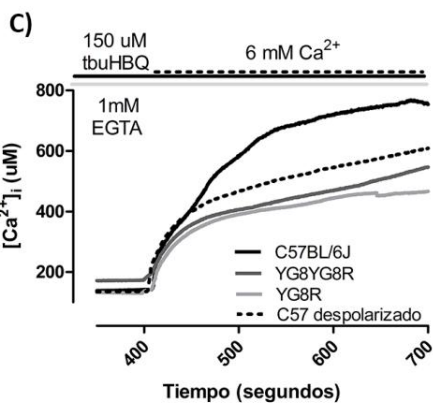
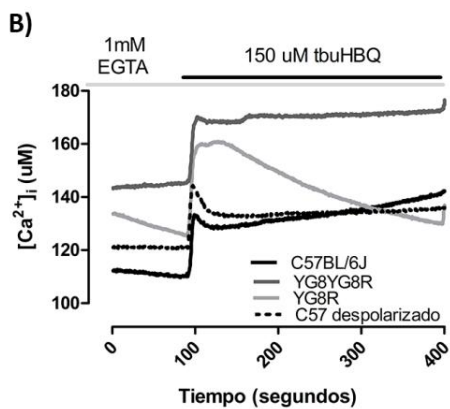
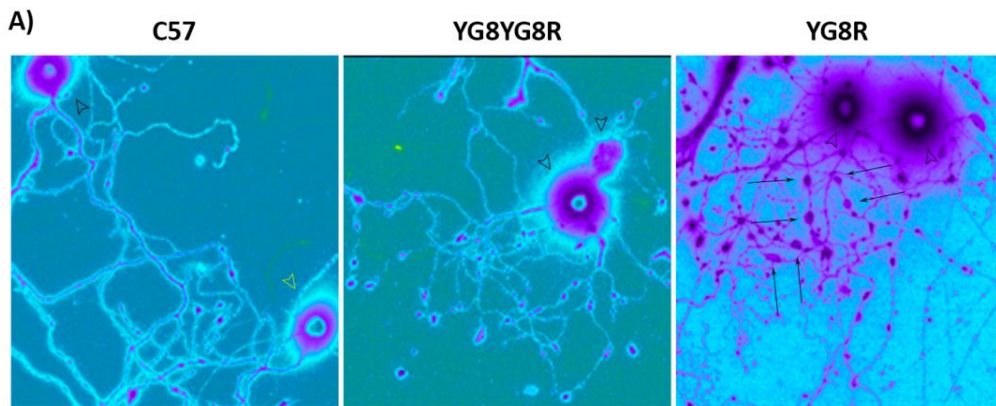
Estudios previos en nuestro laboratorio en la línea celular SHSY5Y confirmaron un fuerte defecto en la capacidad mitocondrial de recaptación del Ca^{2+} debido al déficit de frataxina [18]. Lo que nos sugirió que el retraso en la restauración de los $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que observamos en las neuronas sensitivas deficientes en frataxina podría deberse a un defecto en la capacidad mitocondrial de recaptación del Ca^{2+} provocado por el déficit de frataxina.

Observamos que el control despolarizado no presenta el retraso en el tamponamiento del Ca^{2+} intracelular en el soma (**Figura 49B**) sugiriendo que otros procesos, como el estrés oxidativo y el fallo energético asociados a la pérdida de frataxina, están participando en la mayor pérdida de recaptación mitocondrial en las neuronas sensitivas deficientes. También otros procesos celulares como la bomba de Ca^{2+} ATPasa (PMCA) de la MP puede estar más afectada por el estrés oxidativo y el fallo energético en las neuronas sensitivas deficientes y favorecer el retraso en la restauración de los niveles del Ca^{2+} citosólico.

También observamos que la depleción de los almacenes del RE, tras la adición del tBuHBQ, no está afectada en los ratones deficientes en frataxina respecto al control C57BL/6J. Este resultado indica que la disfunción mitocondrial en el déficit de frataxina no influye en los almacenes del RE y en su vaciamiento, ni en el soma (**Figura 49B**) ni en la red neurítica (**Figura 49F**).

Tras la depleción de los depósitos celulares con tBuHBQ y al añadir el exceso de CaCl_2 al medio extracelular se induce la entrada del Ca^{2+} mediante el mecanismo del SOCE. Observamos que las neuronas sensitivas deficientes en frataxina muestran una acentuada disminución de la entrada de Ca^{2+} extracelular mediada por SOCE con respecto al control C57BL/6J, en el soma (**Figura 49C y 49E**) y en la red neurítica (**Figura 49G y 49I**). El control despolarizado muestra el mismo defecto en el SOCE, en el soma y en el axón, sugiriendo que la despolarización mitocondrial está implicada en el defecto del SOCE que presentan las neuronas sensitivas deficientes en frataxina, posiblemente por disminuir la capacidad tamponadora de la mitocondria.

El estudio de los mecanismos que regulan el Ca^{2+} intracelular en las neuronas sensitivas del modelo murino FRDA nos ha permitido confirmar que el déficit de frataxina conlleva una disfunción en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en el soma y en la red neurítica, con un aumento del nivel basal de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mantenido en el tiempo y un defecto en el mecanismo del SOCE.



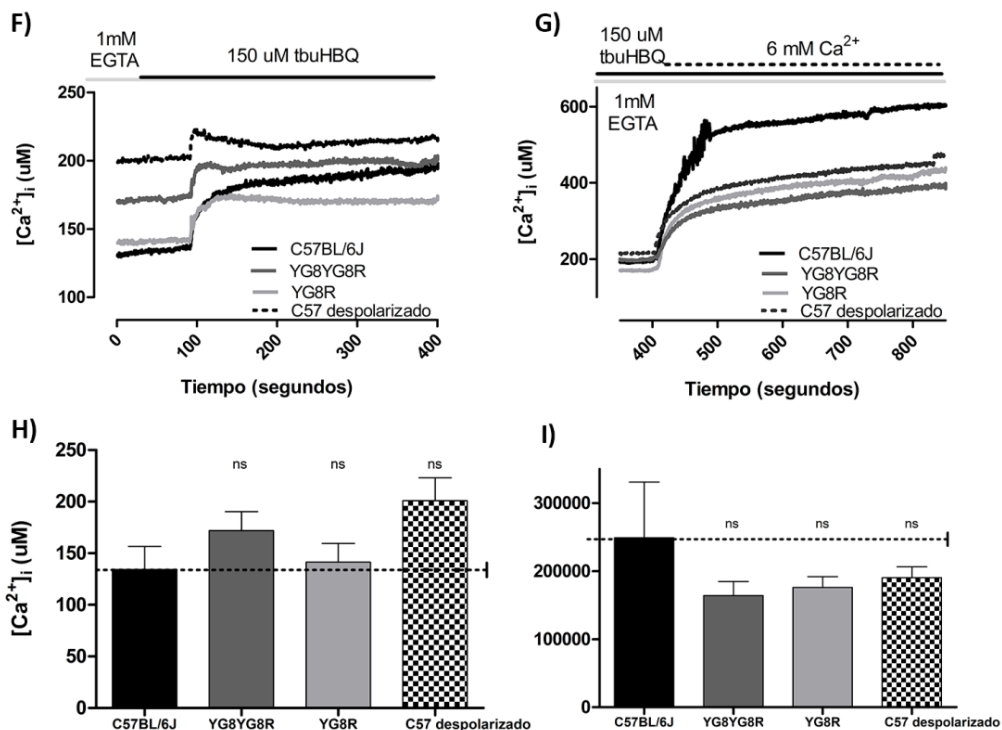


Figura 49. Detección del calcio intracelular mediante la sonda Fura-2 en neuronas sensitivas in vivo del modelo murino FRDA.

A) Imagen representativa de la fluorescencia del Fura-2 AM en el cultivo neuronal *in vivo*, la imagen muestra el ratio entre F340/F380, indicativo del Ca^{2+} citosólico basal antes de inducir la movilización del Ca^{2+} . El marcaje del Ca^{2+} citosólico con Fura-2 AM revela la presencia de grandes esferoides axonales en las neuritas de los ratones deficientes en frataxina. Las cabezas de flecha [∇] indican los somas neuronales y las flechas [↑] indican los esferoides axonales con marcaje de Fura-2 AM en las neuritas. **B, C, G, F)** Las gráficas muestran la movilización del Ca^{2+} intracelular por efecto del tBuBHQ en un medio libre de Ca^{2+} y la entrada de Ca^{2+} mediante SOCE por efecto de la adición de Ca^{2+} al medio en la soma neuronal (B,C) y en la red neurítica (F, G). **D, E, H, I)** Las gráficas muestran la media de la $[Ca^{2+}]_i$ basales y la media del AUC, que cuantifica la entrada de Ca^{2+} mediante el SOCE, en el soma neuronal (D, E) y en la red neurítica (H,I). Los datos representan la media \pm S.E.M, de al menos tres repeticiones experimentales biológicas, con un total de 32, 40, 31 y 31 neuronas medidas para C57BL/6J, YG8R, YG8YG8R y control despolarizado, respectivamente. Análisis ANOVA unifactorial por genotipo y nivel de significación ns=no significativo.

Nuestros resultados han confirmado que las neuronas sensitivas deficientes en frataxina, presentan una disfunción mitocondrial, sufriendo despolarización mitocondrial y estrés oxidativo, que favorecen el fallo energético. Estos tres procesos mitocondriales están muy implicados en la homeostasis del calcio celular, de forma que la despolarización mitocondrial y el estrés oxidativo favorecen la salida de Ca^{2+} de la mitocondria y la disminución de la recaptación mitocondrial de Ca^{2+} . Además hemos confirmado una disminución en la capacidad tamponadora del Ca^{2+} por parte de la neurona sensitiva, posiblemente debido a la mitocondria tal y como se había

descrito previamente [18]. Este defecto en la capacidad tamponadora del Ca^{2+} de la mitocondria permitiría el aumento moderado y mantenido en el tiempo de los niveles de Ca^{2+} intracelular así como el defecto en el mecanismo del SOCE que encontramos en las neuronas sensitivas deficientes en frataxina.

La elevación del Ca^{2+} intracelular es un marcador de neurodegeneración. Tal es el caso en la neuropatía diabética, donde se observa, de forma similar a nuestro modelo, una disfunción mitocondrial y una dishomeostasis del Ca^{2+} , que dirigen la neuropatía periférica tipo *dying-back* [149]. Un aumento del Ca^{2+} axoplásmico en los focos donde se presenta agregación disfuncional de la mitocondria, es necesario y suficiente para inducir la degeneración axonal. Además el Ca^{2+} activa proteasas que favorecen el corte proteolítico del citoesqueleto, la disrupción del transporte axonal y la progresión del hinchamiento axonal a esferoides axonales [68]. Por todo ello el aumento de los niveles de Ca^{2+} intracelulares que encontramos en las neuronas sensitivas deficientes en frataxina podría estar participando en la formación de los esferoides axonales y en el proceso de degeneración axonal.

El SOCE, aunque es un mecanismo activado por el vaciamiento del RE para permitir su relleno con el Ca^{2+} extracelular, es muy dependiente de una mitocondria no comprometida. Los defectos mitocondriales que encontramos en las neuronas sensitivas deficientes en frataxina que implican una mitocondria despolarizada, con una capacidad tamponadora disminuida y fallo energético, inactivan el mecanismo del SOCE antes de tiempo. Los canales SOC de la MP se cierran prematuramente inhibidos por el aumento del Ca^{2+} local que la mitocondria no consigue recaptar y por la falta de ATP, impidiendo que los almacenes del RE se rellenen correctamente. El defecto en el transporte de la mitocondria hasta los canales activados para el SOCE y una incorrecta localización mitocondrial también disminuyen el SOCE, como se observa en un modelo deficiente en GDAP1, una proteína mitocondrial responsable de Charcot-Marie-Tooth tipo 4A/2K [150]. Por lo que el defecto en la distribución mitocondrial, que encontramos en las neuronas sensitivas deficientes en frataxina, también podría estar participando en la disminución del SOCE.

El defecto en el SOCE implica que las neuronas deficientes en frataxina pueden estar sufriendo un defecto en procesos neuronales regulados por la señalización por calcio celular tan importantes como la transmisión sináptica, el crecimiento axonal y la regulación génica.

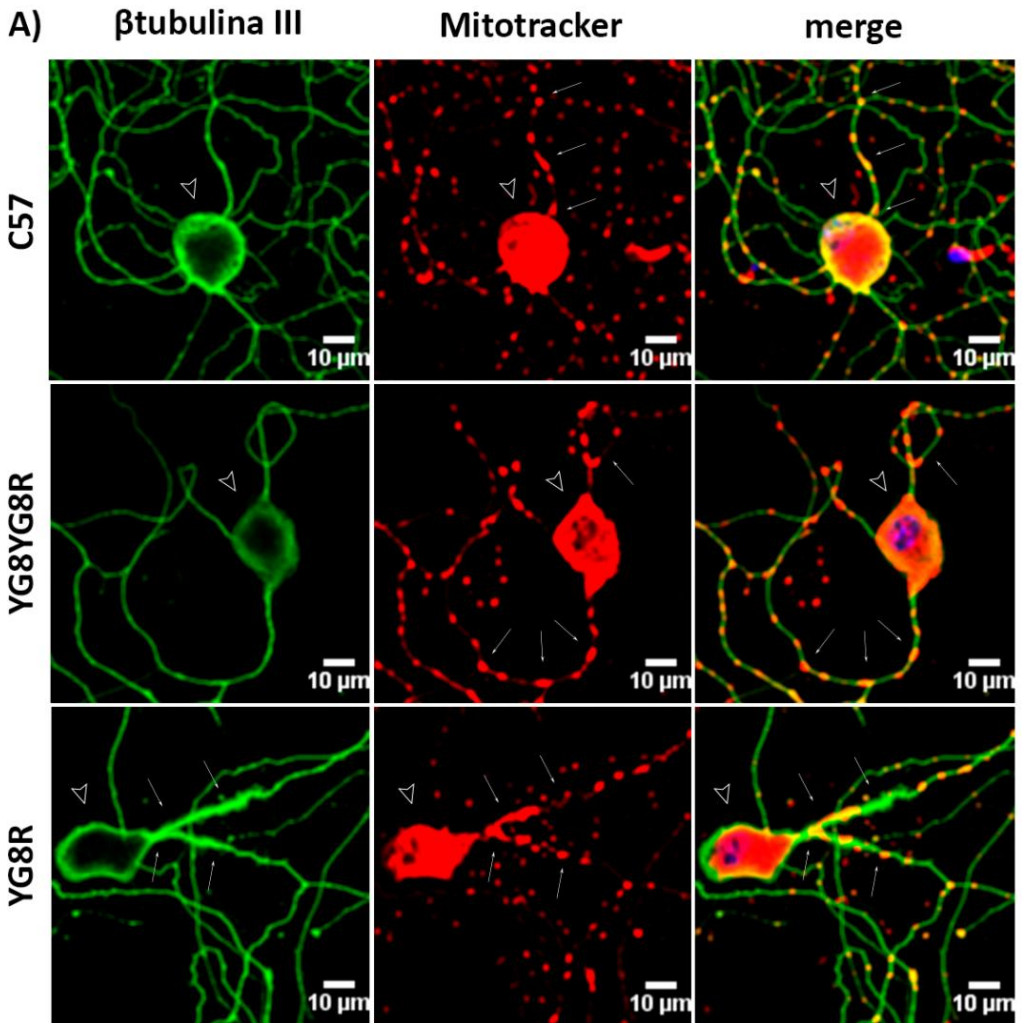
2.4.5. El déficit de frataxina provoca defectos en la morfología mitocondrial

El déficit de frataxina causa la aparición de distrofia axonal indicativa de un proceso de neurodegeneración axonal, en el que se ha demostrado que participan la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo y un aumento moderado y mantenido en el tiempo de los niveles de Ca^{2+} intracelular. La distrofia axonal en el ratón YG8R se presenta de forma heterogénea, con la aparición de múltiples esferoides axonales de diferentes formas y tamaños. Hemos confirmado la presencia de muchos marcadores en los esferoides axonales, pero debido a que la mitocondria es el orgánulo que más

predomina en ellos y a que la disfunción mitocondrial está implicada en su formación, se decidió analizar la morfología mitocondrial para cuantificar el grado de formación de esferoides axonales y de neurodegeneración axonal. Para ello se realizó un cultivo primario de ganglio dorsal de ratón de 24 meses de edad. A los 5 *div* se marcó la mitocondria con la sonda mitotracker deep red y se detectaron las neuronas con β -tubulinIII mediante IFI. La descripción de los parámetros morfológicos de la mitocondria se realizó en la zona proximal de la neurita, desde que sale del soma hasta la primera bifurcación. Se utilizó el macro "mito-morphology" diseñado para el ImageJ, por Ruben K. Dadga y colaboradores para analizar el número de mitocondrias/100 μm , el % de área celular ocupado por la mitocondria, el índice de elongación que indica lo alargadas que son y si están fragmentadas, el índice de interconectividad que indica la relación de la red mitocondrial consigo misma como una única masa interconectada de red reticular y la hinchazón mitocondrial que indica el cambio en la morfología mitocondrial de tubular a esferoide y es un índice que permite diferenciar entre la hinchazón y la masa interconectada. Para conocer el papel de la despolarización mitocondrial y el aumento de los niveles de Ca^{2+} intracelulares en la aparición de la distrofia axonal se incluyeron controles de ambas situaciones. Para ello se trataron las neuronas sensitivas del control C57BL/6J con CCCP-oligomicina para despolarizar la membrana mitocondrial (control despolarizado) y con el ionóforo Br-A23187, que permeabiliza todas las membranas y origina un gran aumento de los niveles de Ca^{2+} intracelular (control A23).

Las imágenes de microscopía confocal de la **Figura 50A** muestran en el control C57BL/6J una red neurítica normal, sin alteraciones, con una mitocondria que presenta un número y tamaño normales y una distribución homogénea por toda la red neurítica. El ratón YG8YG8R no presenta alteraciones evidentes en la red neurítica aunque se deja intuir que las mitocondrias son más redondas y están más acumuladas. Sin embargo el ratón YG8R sí presenta ya una alteración patológica evidente con una gran hinchazón de la neurita en la zona proximal que acumula o retiene una gran cantidad de mitocondria. Los resultados sugieren que el grado de afectación axonal y mitocondrial que presentan las neuronas sensitivas se correlaciona con la cantidad de frataxina que expresan, de forma que el ratón YG8R, con menos frataxina, presenta la degeneración axonal más severa.

Observamos en la **Figura 50B** que los controles con la mitocondria despolarizada y el control A23 presentan grandes esferoides axonales en todas las neuritas con evidentes acumulaciones de mitocondria hinchada. Estos resultados confirman que las situaciones patológicas como la despolarización mitocondrial y el exceso de Ca^{2+} intraaxonal, que sufren las neuronas sensitivas deficientes en frataxina, están implicadas en la formación de los esferoides axonales y el desarrollo de la distrofia axonal en el modelo FRDA.



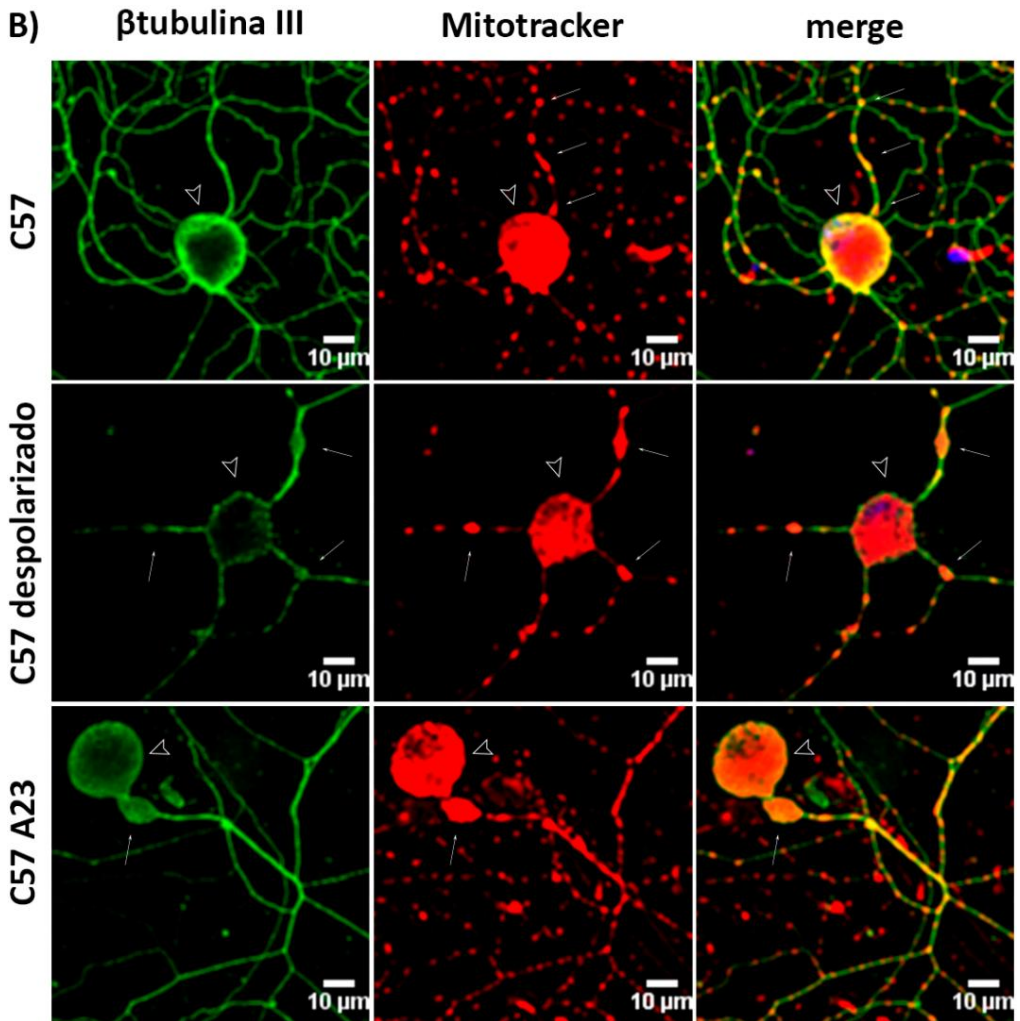


Figura 50. Patrón de la red neurítica y mitocondrial en neuronas sensitivas del modelo murino FRDA.

Las imágenes de microscopía confocal muestran la fluorescencia del marcaje mitocondrial con mitotracker deep en rojo y la fluorescencia del marcaje neuronal con β -tubulina III en verde. Las imágenes son representativas de la morfología mitocondrial y del citoesqueleto de las neuronas sensitivas del ganglio dorsal. **A)** Se observa la formación de esferoides axonales con acumulación mitocondrial en el ratón deficiente YG8R. **B)** y en los controles despolarizado y con exceso de Ca^{2+} intraaxonal. Las cabezas de flecha [∇] indican los somas neuronales y las flechas [\uparrow] indican los esferoides axonales con mitocondria acumulada en las neuritas. Microscopía confocal a 40x con aceite de inmersión.

El análisis de los parámetros morfológicos de la red mitocondrial se realizó en los ratones YG8R, por presentar alteraciones más evidentes que el YG8YG8R, y se comparó con el control C57BL/6J. Los controles con la mitocondria despolarizada y el aumento de los niveles de Ca^{2+} intracelulares también se incluyeron en el análisis.

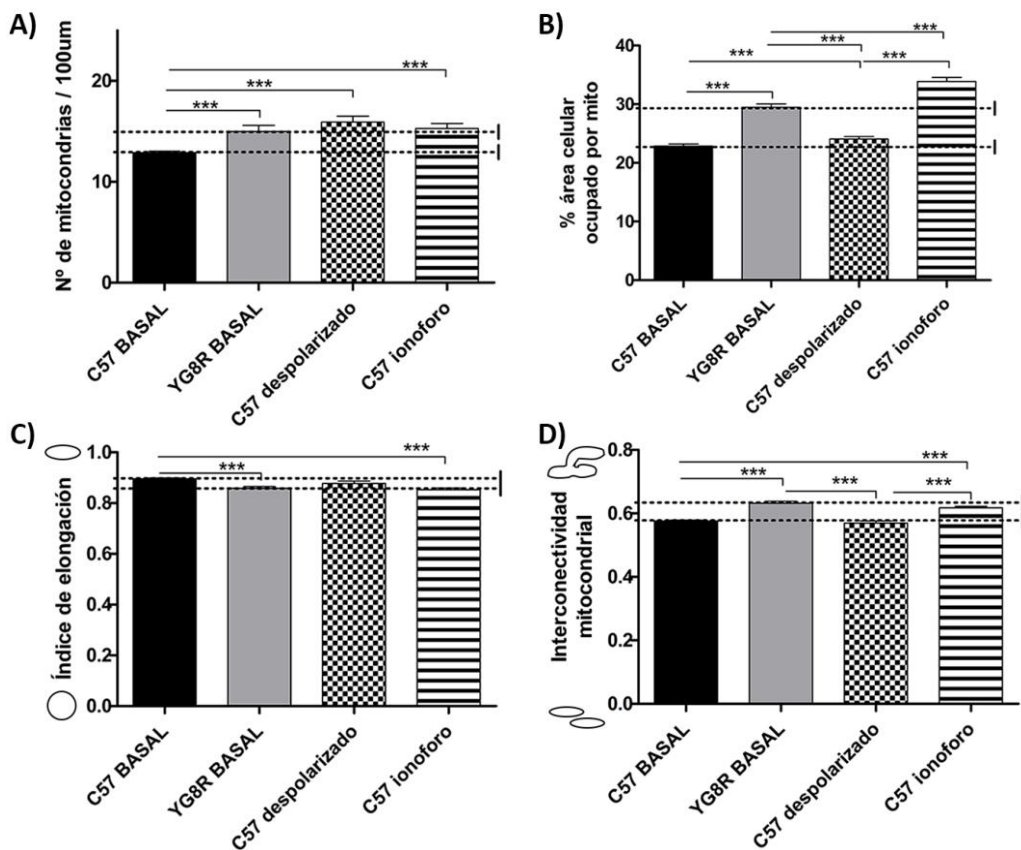
Los resultados muestran que el ratón YG8R presenta mayor número de mitocondrias en 100 μm de neurita (**Figura 51A**) y que estas mitocondrias ocupan una mayor superficie de la neurita de forma significativa con respecto al control C57BL/6J (**Figura 51B**). Las mitocondrias del ratón YG8R presentan un índice de elongación menor que las del control C57BL/6J (**Figura 51C**) indicando que pierden la morfología elongada y se hacen más redondas. Las mitocondrias del ratón YG8R presentan un índice de interconectividad mayor que las del control C57BL/6J (**Figura 51D**) indicando que se conectan más unas con otras formando unidades mitocondriales más grandes. Las mitocondrias del ratón YG8R presentan un índice de hinchazón mayor que las del control C57BL/6J (**Figura 51E**) indicando que están más hinchadas. Una mitocondria hinchada se hace más esferoide, que es coincidente con la disminución del índice de elongación. El índice de hinchazón diferencia entre las mitocondrias más grandes porque están más interconectadas de las mitocondrias más grandes porque se han hinchado, debido a que tiene en cuenta la morfología. La distribución de los índices de hinchazón de las mitocondrias analizadas (**Figura 51F**) muestra índices de hinchazón mitocondrial menores a 2 en el control C57BL/6J, sin embargo las mitocondrias del ratón YG8R llegan a presentar índices de hinchazón mitocondriales de hasta casi 4, es decir el doble.

El aumento del número de mitocondrias puede ser causado por distintos cambios en la biología mitocondrial: una alteración del equilibrio fusión-fisión mitocondrial, un aumento de la masa total mitocondrial o un defecto en el transporte mitocondrial. En nuestro caso la red mitocondrial está más interconectada, por lo que se descarta que la fisión aumente el número de mitocondrias. El aumento en la biogénesis mitocondrial no lo podemos analizar porque la medición se ha realizado en la porción proximal de las neuritas, por lo que no podemos saber si hay más o menos biogénesis mitocondrial. Aunque no podemos descartar completamente que exista un ligero aumento de la masa mitocondrial, como vimos en los tejidos neuronales, en los que el ratón YG8R presenta un aumento de las proteínas mitocondriales TOM22 (MME) y OPA1 (MMI) indicando un aumento de la masa mitocondrial principalmente en las raíces nerviosas (**Figura 34D** del apartado 2.3.2 de resultados). Con todo ello y con los resultados obtenidos hasta ahora que han confirmado una distribución anómala de la mitocondria con un bloqueo del transporte axonal en general, podemos sugerir que el aumento del número de mitocondrias en la zona proximal de las neuritas se debe a una acumulación en la zona proximal de las neuritas debido al impedimento en su transporte hacia la zona distal de las neuritas.

Por lo tanto, los resultados sugieren que las mitocondrias deficientes en frataxina son más redondas, están más hinchadas y aumentan su interconectividad, posiblemente para contrarrestar la disfunción mitocondrial debida al déficit de frataxina, quedándose más agregadas en la zona proximal de las neuritas, lo que hace más difícil su transporte.

Los resultados muestran que el animal control, con un aumento del Ca^{2+} intraaxonal, presenta las mismas alteraciones en morfología mitocondrial que se observan en el ratón deficiente en frataxina, sin embargo el control despolarizado comparte menos

alteraciones. Esto sugiere que aunque la despolarización mitocondrial también afecta al fenotipo patológico en estas neuronas induciendo, por ejemplo, la formación de esferoides axonales, son las alteraciones en la concentración de Ca^{2+} intraaxonal las que mejor reproducen los cambios morfológicos mitocondriales en el ratón YG8R. Por tanto, los fallos que genera el déficit de frataxina en la regulación del Ca^{2+} pasan a tener mucha mayor relevancia, planteándose hasta qué punto es éste un proceso primario en vez de ser una consecuencia a posteriori.



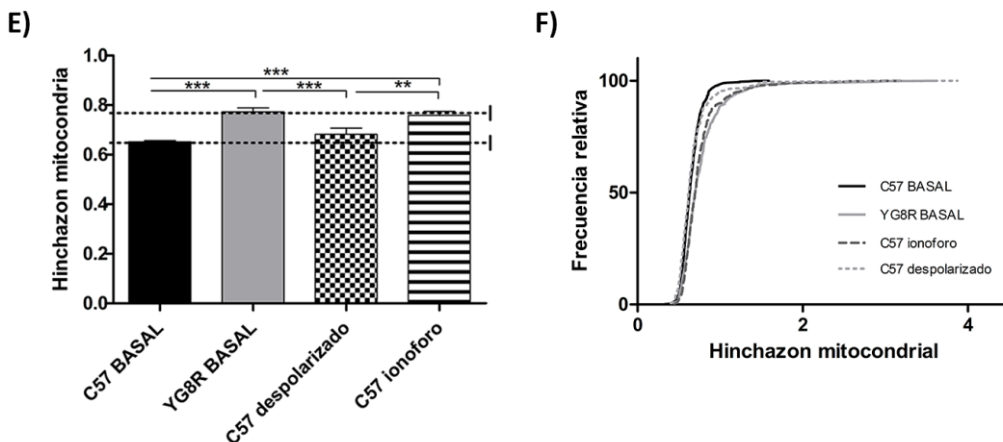


Figura 51. Cuantificación de los descriptores de la morfología mitocondrial en neuronas sensitivas del modelo murino FRDA.

A) Número de mitocondrias por 100 μm de neurita. **B)** Porcentaje de la superficie axonal ocupada por la mitocondria **C)** Índice de elongación, corresponde a la media de la inversa de la circularidad de las mitocondrias analizadas. **D)** Interconectividad mitocondrial, corresponde a la media del ratio área/perímetro de las mitocondrias analizadas. **E)** Hinchazón de la mitocondria, corresponde al índice de interconectividad normalizado con el índice de elongación o circularidad para medir el hinchamiento de la mitocondria. **F)** Distribución de los tamaños de la hinchazón mitocondrial. Los datos representan la media \pm S.E.M de tres repeticiones experimentales con un total de 185, 197, 59 y 99 neuronas medidas para C57BL/6J, YG8R, control despolarizado y control tratado con ionóforo A23, respectivamente. Análisis ANOVA unifactorial por genotipo y nivel de significación * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

En su conjunto, los resultados del estudio de la función y la morfología mitocondrial en la neurona sensitiva del modelo murino FRDA han confirmado que la disfunción mitocondrial debido al déficit de frataxina provoca un estrés oxidativo y un incremento en los niveles de Ca^{2+} intracelulares y juntos causarían el daño de proteínas mitocondriales y del citoesqueleto, que se acumulan formando los esferoides axonales. El estrés oxidativo y los niveles de Ca^{2+} intracelulares también ha sido descrito como promotores de la distrofia axonal en cultivo primario de neuronas sensitivas de modelos murinos de diabetes [149, 151, 152], de infecciones virales [145], y de toxicidad por compuestos organofosforados [153].

Además de ser disfuncional la red mitocondrial aparece esférica, hinchada e interconectada y se queda retenida en la zona proximal de las neuritas, causando un defecto en su transporte y distribución axonal. Esta red mitocondrial disfuncional y desestructurada provoca un gran defecto en el mecanismo del SOCE, que conlleva una ineficiente señalización por calcio celular con consecuencias en la transmisión sináptica, crecimiento axonal o transcripción génica.

Todos los hechos patológicos que hemos encontrado en las neuronas sensitivas del modelo murino FRDA sugieren que sufren un modelo de lesión multifocal. De igual forma que se ha descrito el modelo de degeneración axonal focal o FAD (*focal axonal damage*) en lesiones de pacientes de esclerosis múltiple [73]. En nuestro modelo deficiente en frataxina el estrés oxidativo y la dishomeostasis del Ca^{2+} actúan como

factores iniciadores de lesión focal axonal, siendo la patología mitocondrial focal intraaxonal un signo ultraestructural de daño temprano que precede a los cambios morfológicos del axón por rotura proteolítica.

En nuestras neuronas sensitivas la formación de lesiones focales a lo largo de las neuritas implican un defecto en el transporte axonal de mitocondria y nutrientes y muy probablemente una insuficiente señalización por Ca^{2+} en la terminación sináptica que, trasladaría el daño focal axonal a la sinapsis neuronal.

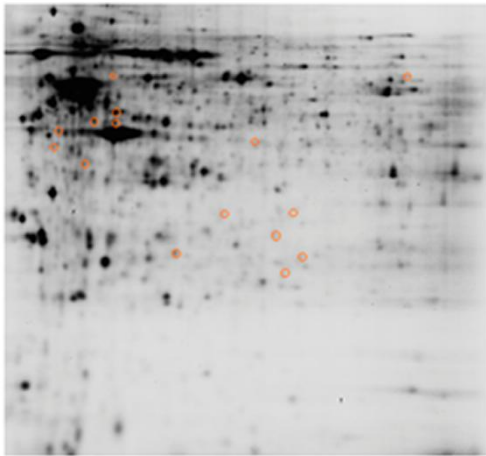
En la fase final de la degeneración axonal la dishomeostasis iónica que acumula Ca^{2+} intraaxonal activa a la enzima proteolítica calpaína y causa la rotura focal del citoesqueleto axonal. En nuestras neuronas sensitivas deficientes en frataxina hemos observado muchas alteraciones en el citoesqueleto pero no aparece una rotura evidente de las neuritas, es decir que sufren las fases de formación de esferoides y desensamblaje del citoesqueleto sin llegar a la fase final de rotura del citoesqueleto y desintegración de las neuritas. Todo esto sugiere que el cultivo primario de ganglio dorsal aporta un modelo *ex vivo* de la degeneración axonal muy útil para la investigación de los mecanismos moleculares bioquímicos que subyacen en la neurodegeneración de la FRDA.

3. Los ratones deficientes en frataxina presentan un defecto en la expresión diferencial de proteínas del ganglio dorsal

Con el objetivo de identificar biomarcadores relacionados con el déficit de frataxina y conocer los mecanismos moleculares implicados en la degeneración de las neuronas sensitivas del ganglio dorsal se realizó el estudio del perfil proteómico completo del ganglio dorsal en el modelo murino FRDA. Para ello se comparó el perfil proteómico del ganglio dorsal de ratón YG8R frente al del control C57BL/6J a los 24 meses de edad mediante 2D-DIGE.

La separación de las proteínas mediante 2D-DIGE reveló 15 *spots* con niveles de expresión diferencial significativa ($p < 0.05$) (**Figura 52**) que se analizaron por MALDI-TOF-TOF o líquido masas, LC-MS/MS, y se identificaron 964 proteínas diferenciales, correspondiendo a 495 genes diferentes. De manera muy llamativa, todas las proteínas identificadas están reguladas a la baja en los ratones deficientes en frataxina YG8R con respecto al control C57BL/6J.

A)



B)

Pos.	Master No.	T-test	Av. Ratio
1	979	0.0091	-1.64
2	982	0.033	-4.19
3	1459	0.0047	-1.55
4	1563	0.0094	-1.38
5	1571	0.027	-1.78
6	1696	0.034	-1.52
7	1841	0.0086	-1.69
8	1894	0.035	-1.93
9	2064	0.0045	-1.33
10	2653	0.016	-1.48
11	2658	0.043	-1.31
12	2965	0.0061	-1.53
13	3120	0.0016	-1.49
14	3212	0.013	-1.46
15	3385	0.017	-1.48

Figura 52. Diferencias en la composición de proteínas en el ganglio dorsal del modelo murino FRDA.

A) Mapa 2D de las preparaciones de ganglio dorsal de ratón. Los *spots* redondeados presentan cambios en los niveles de expresión de las proteínas que fueron identificadas por MALDI/TOF-TOF. **B)** Tabla que especifica los *p* valor para cada uno de los *spots* identificados con una expresión diferencial mayor a 1.3 en los ratones YG8R deficientes en frataxina con respecto al control C57BL/6J.

El análisis proteómico diferencial de ganglio dorsal en el ratón YG8R de 24 meses, en relación al control C57BL/6J, ha revelado un defecto en la expresión de proteínas implicadas en un amplio rango de procesos biológicos (**Figura 53**).

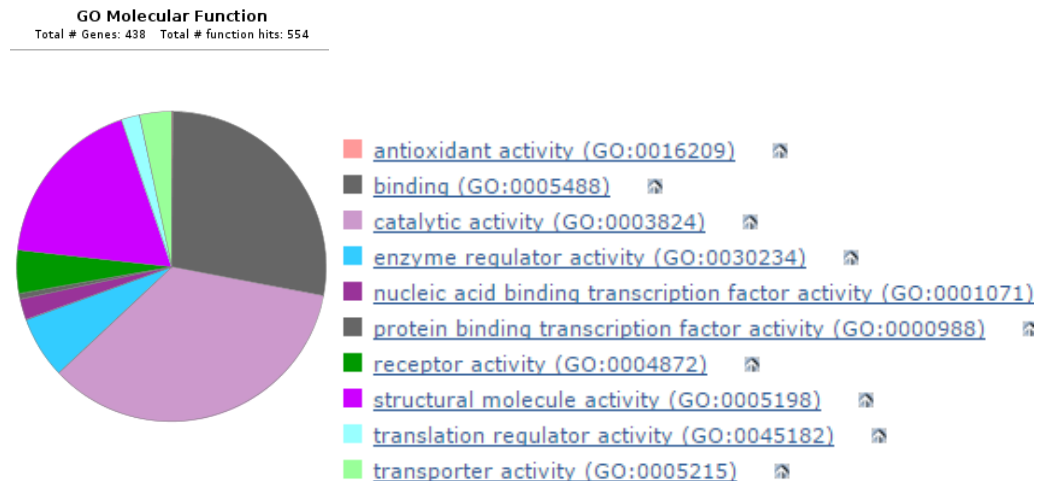


Figura 53. Representación de las funciones moleculares de las proteínas expresadas diferencialmente en el ratón YG8R.

El estudio de la función molecular según la base de datos *Gene Ontology* (GO) con el sistema de clasificación *Panther* (<http://www.pantherdb.org>) reveló que el 44,30% tienen actividad catalítica (GO:0003824), el 35,20% tienen actividad de unión (GO:0005488), el 22,80% tienen actividad de molécula estructural (GO:0005198), el 8,20% tienen actividad reguladora de enzimas (GO:0030234), el 5,70% tienen actividad receptor (GO:0004872), el 2,70% tienen actividad de factor de transcripción de unión a ácido nucleico (GO:0001071), el 2,50% tienen actividad reguladora de la traducción (GO:0045182), el 0,70% tienen actividad de factor de transcripción de unión a proteína (GO:0000988) y el 0,20% tienen actividad antioxidante (GO:0016209).

El listado de 495 proteínas es muy extenso, por lo que para contextualizarlas en procesos celulares específicos se utilizaron las herramientas de *Panther* (<http://www.pantherdb.org>) y *Paintomics* (<http://www.paintomics.org>). Estas herramientas identifican las proteínas dentro de las vías *Panther* (*Protein Annotation Through Evolutionary Relationship*) y KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). *Panther* y KEGG son colecciones de bases de datos en línea que representan informáticamente el sistema biológico, es decir, son colecciones de esquemas que registran las redes de interacciones moleculares dentro de las células. El análisis identificó que las 495 proteínas aparecen implicadas en 82 vías *Panther* y 199 vías KEGG distintas.

De todas ellas se detalla a continuación el análisis de las dos vías que consideramos que tienen mayor relevancia. La primera es la fosforilación oxidativa, por ser la vía clásicamente implicada en la fisiopatología de la FRDA. La segunda es la señalización por calcio, por ser una vía de señalización celular muy novedosa en el campo de la FRDA, que en base a todos los resultados presentados claramente está participando en el proceso de neurodegeneración de las neuronas sensitivas.

3.1. La falta de frataxina causa el déficit de subunidades proteicas de los complejos de la OXPHOS y de enzimas antioxidantes

El análisis proteómico del ganglio dorsal confirmó la disminución de nueve proteínas con gran relevancia en la actividad de la OXPHOS en el ratón deficiente en frataxina. En la **Figura 54** se visualizan las proteínas disminuidas en el ratón YG8R de la vía de fosforilación oxidativa en el esquema de la base de datos KEGG. En la **Tabla 11** se detallan los nombres de las proteínas con los parámetros de identificación.

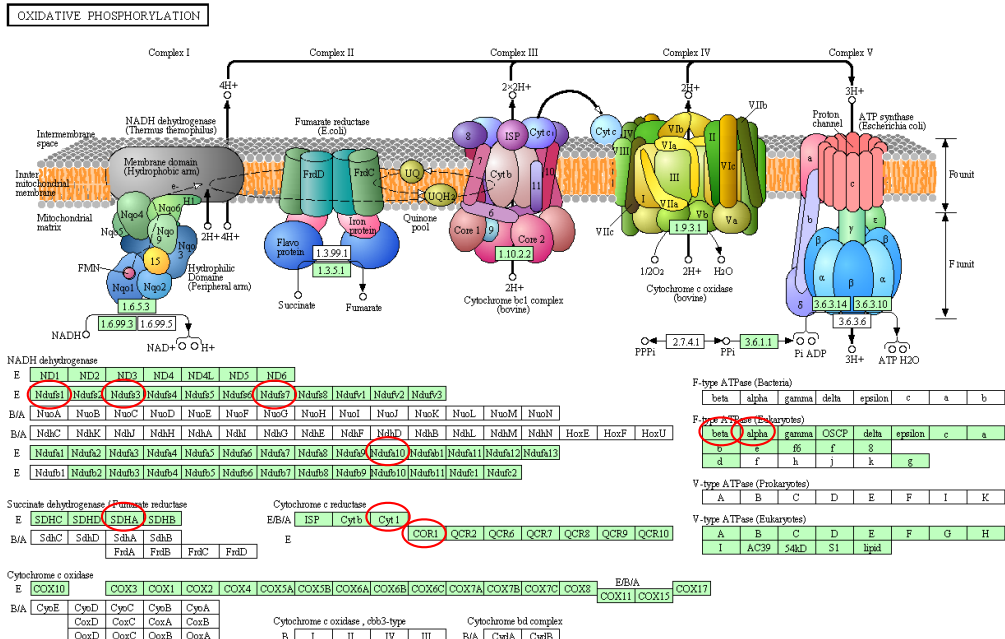


Figura 54. Vía de la fosforilación oxidativa según la base de datos KEGG.

La vía OXPHOS de la base de datos KEGG muestra todas las subunidades proteicas de los 4 complejos de la CTE y el C_V. En círculos rojos están rodeadas todas las subunidades proteicas que aparecen disminuidas en el estudio proteómico del ganglio dorsal del ratón YG8R.

Unused Prot Score	P (95%)	% Cob (95%)	Swissprot accesión / Uniprot ID	Nombre proteína / Nombre gen	Descripción función en Uniprot
335	26	76%	Q9DCT2 / NDUS3_MOUSE	NADH dehidrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitocondrial. GN= Ndufs3	Subunidad del core del C _I de la CTE que pertenece al ensamblaje mínimo requerido para la catálisis. Es uno de los componentes del centro Fe-S.
6.82	4	19,72%	Q99LC3 / NDUAA_MOUSE	NADH dehidrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitocondrial. GN=Ndufa10	Subunidad de la fracción hidrofóbica del C _I de la CTE con actividad NADH deshidrogenasa y oxidoreductasa, transfiere los electrones del NADH a la CTE
1.09	1	2,29%	Q9CWG8 / MIDA_MOUSE	NADH dehidrogenase [ubiquinone] complex I, assembly factor 7. GN= Ndufaf7	Subunidad implicada en el ensamblaje o estabilidad del C _I de la CTE.

Resultados 3: perfil proteómico del ganglio dorsal en el modelo murino FRDA

11.85	7	14,16%	Q91VD9 / NDUS1_MOUSE	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial. GN=Ndufs1	Subunidad del core del C _i de la CTE que pertenece al ensamblaje mínimo requerido para la catálisis. Subunidad formadora del centro Fe-S. Forma parte del sitio activo donde se oxida el NADH.
11.70	6	15,51%	Q8K2B3 / DHSA_MOUSE	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial GN=Sdha	Subunidad flavoproteína del C _{ii} de la CTE. Implicada en la transferencia de electrones desde el succinato al CoQ.
1.49	2	10,20%	Q99LC5 / ETFA_MOUSE	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial. GN=Etfa	Flavoproteína que transfiere electrones desde la acil-CoA DH al CoQ.
2.03	1	2,06%	Q64521 / GPDM_MOUSE	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial. GN=Gpd2	Localizada en la MMI cataliza la conversión del glycerol-3-fosfato en dihidroacetona fosfato usando FAD como cofactor
13.93	8	27,50%	Q9CZ13 / QCR1_MOUSE	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial GN=Uqcrc1.	Subunidad flavoproteína del C _{iii} de la CTE. Media la formación del complejo entre Cit c y Cit c1. .
7.77	5	25,85%	Q9D0M3C/ Y1_MOUSE	Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial GN=Cyc1	Componente hemo del complejo Cit b-c1., el cual acepta los electrones del grupo Rieske y transfiere los electrones al Cit c en la CTE.
4.05	2	3,97%	Q03265 / ATPA_MOUSE	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial GN=Atp5a1	Las subunidades α y β forman el core catalítico en el dominio estructural F ₁ del C _{iv} de la CTE. Los dímeros $\alpha\beta$ permiten la síntesis de ATP a partir de ADP y Pi en la subunidad β .
36.97	27	58,78%	P56480 / ATPB_MOUSE	ATP synthase subunit beta, mitochondrial GN=Atp5b	
22.40	11	46,99%	Q91W90 / TXND5_MOUSE	Thioredoxin domain-containing protein 5 GN=Txndc5	Enzima con actividad tiorredoxina. Disminuye los puentes disulfuro de la insulina.
1.89	1	8,57%	P10639	Thioredoxin. GN=Txn	Participa en reacciones REDOX como la S-nitrosilación de residuos de cisteína en respuesta al NO intracelular. Nitrosila la cisteína del sitio activo de la CASP3 en respuesta al NO, inhibiendo la actividad caspasa-3.

Tabla 11. Listado de la identificación de las proteínas diferencialmente expresadas en el ratón YG8R relacionadas con los procesos celulares de la CTE, OXPPOS y sistemas antioxidantes celulares.

Se especifican el Unused Prot Score como indicador de la especificidad de la identificación, el número de péptidos que se han identificado de la proteína (P) al 95% de confianza, el porcentaje de cobertura (% Cob) de la secuencia total identificado a un 95% de confianza, código de identificación de la proteína en la base de datos SwissProt/Uniprot, nombre de la proteína y del gen y breve descripción de la función.

Los resultados del análisis proteómico del ganglio dorsal de ratón YG8R muestran la disminución de cuatro subunidades proteicas del C_i de la CTE, NDUFS3, NDUFA10, NDUFAF7 y NDUFS1. NDUFS3, NDUFA10 y NDUFS1 son subunidades implicadas directamente en el flujo de electrones del *core* catalítico del C_i, además NDUFS3 y NDUFS1 forman parte de los centros Fe-S. Mutaciones en los genes de estas tres subunidades causan deficiencia de actividad del C_i y están implicadas en la enfermedad de Leigh y en la enfermedad de Parkinson relacionado con el déficit de

PINK1 [154]. NDUFAF7 es una subunidad implicada en el ensamblaje y estabilidad del C_i. Por lo tanto el déficit de estas subunidades en las neuronas deficientes en frataxina debe tener una importante relevancia en el defecto de actividad de la CTE.

El ratón YG8R presenta la disminución en el C_{ii} de la subunidad SDHA. La SDHA es la subunidad catalítica que transforma el succinato en fumarato transfiriendo los electrones al CoQ. No es la subunidad que contiene centros Fe-S del C_{iii}, pero es una de las subunidades que interacciona genética y físicamente con frataxina [30]. Mutaciones en el gen de la SDHA han sido asociadas con síndrome de Leigh, miocardiopatía hipertrófica, ataxia óptica de debut tardío, ataxia y miopatía [155]. Por lo tanto el déficit de esta subunidad en las neuronas deficientes en frataxina debe tener una importante relevancia en el defecto de la actividad de la CTE, pero también podría estar relacionado con otras sintomatologías que presentan los pacientes de FRDA como la miocardiopatía hipertrófica.

El ratón YG8R presenta la disminución de las subunidades Core1 y Cit c1 en el C_{iii} de la CTE. Core1 es la proteína que media la formación del complejo entre los Cit c y Cit c1. La disminución de la subunidad Core1 está asociada a patologías como Alzheimer y Síndrome de Down. Y la subunidad Cit c1 forma parte del grupo hemo implicado directamente en el flujo de electrones. Mutaciones en el gen CYC1 causa hiperglucemia que responde a la insulina [156]. Por lo tanto el déficit de estas subunidades en las neuronas deficientes en frataxina debe tener una importante relevancia en el defecto de actividad de la CTE y puede estar asociada a la diabetes tipo II que desarrollan los paciente de ataxia de Friedreich.

El ratón YG8R presenta la disminución de dos proteínas de entrada alternativa de electrones, ETFA y GPD2, que transfieren electrones a la CTE. La ETFA participa en el paso inicial de la β -oxidación de los ácidos grasos en la mitocondria y es capaz de interaccionar genética y físicamente con frataxina [30]. Defectos en las ETF han sido implicados en la aciduria glutárica tipo II. La glicerol-3-P deshidrogenasa 2 mitocondrial, GPD2 o G3PDH2, forma parte de la lanzadera para la oxidación del NADH citosólico que proviene del ciclo de Krebs. Enfermedades asociadas con GPD2 incluyen diabetes tipo II y acidemia metilmalónica. Por lo tanto, el déficit de esta subunidad en las neuronas deficientes en frataxina debe tener una importante relevancia en el defecto de la actividad de la CTE, y puede estar asociada a la diabetes tipo II que desarrollan los pacientes de ataxia de Friedreich.

El ratón YG8R presenta la disminución en el C_v de las subunidades ATPasa tipo F α y β , donde se fosforila el ADP para generar el ATP. Por lo tanto el déficit de estas subunidades en las neuronas deficientes en frataxina debe tener una importante relevancia en la producción de ATP y en el fallo energético asociado en la FRDA.

Adicionalmente el ratón YG8R presenta la disminución de dos proteínas antioxidantes, Txn y Txndc5. El déficit de estas dos enzimas antioxidantes, y de peroxirredoxinas, glutaredoxinas y glutatión-S-transferasa, ya ha sido descrito en el ganglio dorsal del ratón YG8R y relaciona al déficit de frataxina con el proceso de estrés oxidativo que sufren las neuronas sensitivas del YG8R [107].

El análisis proteómico no ha encontrado deficiencias en ninguna subunidad del C_{IV} . Sin embargo, en el análisis de proteínas por WB en los tejidos neuronales el ratón YG8R presentaba una disminución de las subunidades COXI y COXII del C_{IV} en el ganglio dorsal y en las raíces periféricas (**Figura 34A** del apartado 2.3.2 de resultados). Además, la disminución de estas subunidades también se detectó en el modelo de SHSY5Y deficiente en frataxina [18]. Posiblemente la disminución de los *spots* correspondientes a estas subunidades no se ha reproducido en las tres muestras biológicas y no se ha considerado un cambio.

Por el contrario el análisis proteómico ha encontrado deficiencias en la subunidad α del C_V y sin embargo el anticuerpo utilizado frente a la subunidad α del C_{IV} por WB no detectó esta disminución ni en el ganglio dorsal ni en las raíces periféricas (**Figura 34A** del apartado 2.3.2 de resultados). Posiblemente si realizamos la validación de la subunidad β por WB encontraríamos esta disminución ya que la confianza con la que se ha detectado en el análisis proteómico es muy alta.

En su conjunto los resultados del análisis proteómico indican que el déficit de frataxina en el ratón YG8R está implicado en un defecto en la OXPHOS, afectando cinco puntos de transferencia de electrones en los C_I , C_{II} y C_{III} , dos puntos de entrada alternativa de electrones y dos puntos de producción de ATP en el C_V . Disminuyen algunos centros Fe-S del C_I y C_{III} pero no se afectan los del C_{II} ni los grupos hemo del C_{IV} , sugiriendo que el déficit de frataxina no afecta por igual a la biosíntesis de todos los centros Fe-S. Disminuyen las proteínas con las que frataxina interacciona físicamente SDHA y la ETFA, sugiriendo que además de poder participar en la modulación de su actividad también es importante para su presencia y conservación. Y finalmente disminuyen algunos sistemas antioxidantes.

El bloqueo en siete puntos diferentes del flujo de electrones a lo largo de la CTE, disminuye el $\Delta\psi_m$ y aumenta la producción de ROS, y posiblemente es la causa de la despolarización mitocondrial y el estrés oxidativo que a lo largo de este trabajo se ha confirmado que sufren las neuronas sensitivas del ganglio dorsal del ratón YG8R. Además el bloqueo de la síntesis de ATP sumado a la disminución del $\Delta\psi_m$, posiblemente llevan a la neurona sensitiva a un acusado fallo energético. Esta afectación tan generalizada que conduce a la disfunción mitocondrial con fallo energético y estrés oxidativo, junto con la disminución de las defensas antioxidantes, favorecen el daño oxidativo y el proceso de neurodegeneración que sufre el ratón deficiente YG8R.

Estos resultados son coincidentes con el déficit de las actividades de los C_I , C_{II} y C_{III} de la CTE y de la enzima del ciclo de krebs aconitasa detectados en biopsias endomiocárdicas de pacientes de FRDA [157] y en el tejido cardíaco del modelo murino YG8R [14], con el estrés oxidativo detectado en plasma y orina de pacientes [12, 13] y con el fallo energético que detectamos el modelo de SHSY5Y deficiente en frataxina [18].

El déficit de muchas de estas subunidades de los complejos de la CTE y el estrés oxidativo se han descrito en otras enfermedades neurodegenerativas como Parkinson, Alzheimer, Huntington, esclerosis múltiple y ELA [79, 158], así como en

otras enfermedades mitocondriales hereditarias como neuropatía óptica hereditaria de Leber, el síndrome de MELAS, el síndrome de MERRF y el síndrome de Leigh [159], sugiriendo un mecanismo de degeneración común. La disfunción mitocondrial se revela como el sitio de inicio del daño neuronal. Los defectos en la actividad de la CTE, junto con un desequilibrio de los sistemas antioxidantes, son el mecanismo patogénico que subyace en el defecto del metabolismo energético e inducen la degeneración neuronal.

3.2. La falta de frataxina causa el déficit de las vías de señalización por calcio a través de receptores acoplados a proteínas G (GPCR)

El análisis proteómico del ganglio dorsal confirmó que el ratón deficiente en frataxina YG8R presenta déficits de proteínas implicadas en la señalización celular por calcio. En la **Figura 55** se señalizan las proteínas disminuidas en el ratón YG8R en la vía de señalización por calcio de la base de datos KEGG.

El análisis proteómico del ganglio dorsal no reveló alteraciones evidentes en las proteínas transportadoras del RE, de la mitocondria o de la MP, implicadas en la homeostasis del calcio y del mecanismo del SOCE.

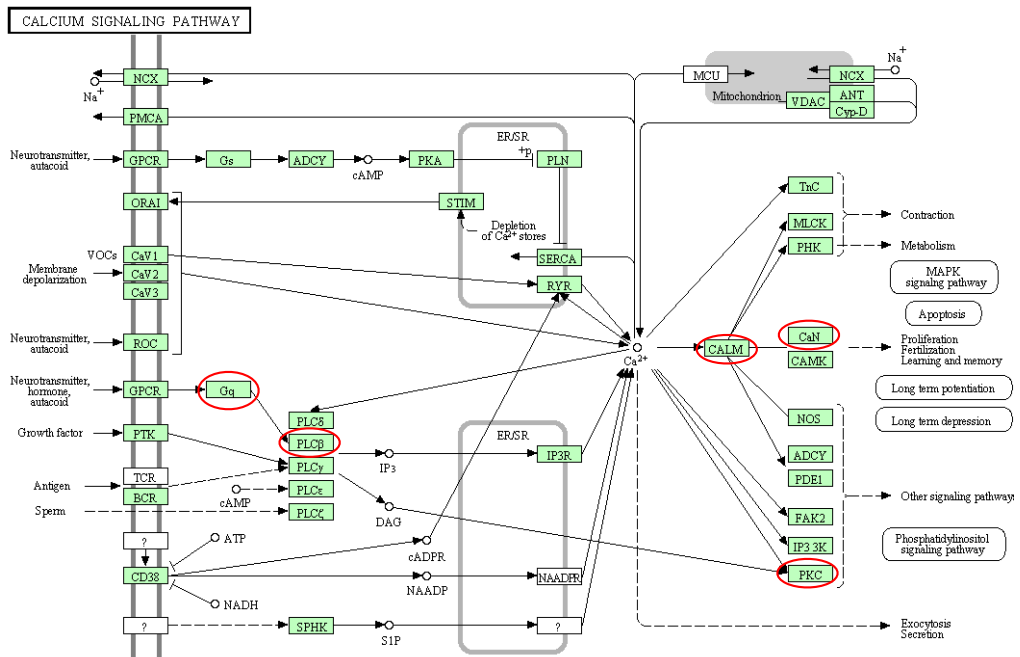


Figura 55. Vía de la señalización por calcio según la base de datos KEGG.

La vía de señalización por calcio de la base de datos KEGG muestra en la parte superior la relación entre la MP, el RE y la mitocondria. En círculos rojos están rodeadas todas las subunidades proteicas que han aparecido disminuidas en el ganglio dorsal del ratón YG8R.

El análisis proteómico del ganglio dorsal confirmó la disminución de 11 proteínas con gran relevancia en la señalización por receptores acoplados a proteína G y en la señalización de segundos mensajeros celulares en el ratón deficiente en frataxina (**Tabla 12**). Esta deficiencia es muy llamativa, ya que los nuevos marcadores específicos de neuronas propioceptivas descritos en esta tesis doctoral, PAC1R y GalR1, son receptores acoplados a proteínas G. Por esta razón decidimos estudiar en detalle la señalización mediada por receptores acopladas a proteína G implicadas en la señalización por calcio intracelular.

Unused Prot Score	P (95%)	% Cob (95%)	Swissprot accesion / Uniprot ID	Nombre proteína / Nombre gen	Descripción función en Uniprot
0	1	5,29	P21278 GNA11_ MOUSE	Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-11 GN=Gna11	Proteína de unión a nucleótido guanina (proteína G). Modulador o transductor de sistemas de señalización transmembrana. Actúa como activador de PLC
1.01	1	5,35	P30677 GNA14_ MOUSE	Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-14 GN=Gna14	Proteína de unión a nucleótido guanina (proteína G). Modulador o transductor de sistemas de señalización transmembrana
9.65	5	18,82	P62874 GBB1_ MOUSE	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1 GN=Gnb1	Proteína de unión a nucleótido guanina (proteína G). Modulador o transductor de sistemas de señalización transmembrana. Las cadenas α y β son necesarias para la actividad GTPasa que reemplaza el GDP por GTP y para la interacción del efector-proteína G.
2	3	8,82	P62880 GBB2_ MOUSE	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2 GN=Gnb2	Proteína de unión a nucleótido guanina (proteína G). Modulador o transductor de sistemas de señalización transmembrana. Las cadenas α y β son necesarias para la actividad GTPasa que reemplaza el GDP por GTP y para la interacción del efector-proteína G. Actividad reguladora de canales del Ca^{2+} .
8.47	5	6,48	P51432 PLCB3_ MOUSE	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphatephosphodiesterase beta-3 GN=Plcb3	La enzima PLC cuando se activa produce dos mensajeros secundarios como son diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3). Se une al Ca^{2+} como cofactor.
2	2	1,78	P20444 KPCA_ MOUSE	Protein kinase C alpha type GN=Prkca	PRKCA, PRKCB y PRKCG se activan por DAG en presencia de Ca^{2+} . Fosforila muchas proteínas regulando positiva o negativamente proliferación, apoptosis, diferenciación, migración y adhesión, hipertrofia cardíaca, angiogénesis, función plaquetaria e inflamación.
0	2	1,78	P68404 KPCB_ MOUSE	Protein kinase C beta type GN=Prkcb	
4.35	2	10,76	Q9DBC7 KAP0_MOUSE	cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit GN=Prkar1a	PRKAR1A, PRKAR1B, PRKAR2B son subunidades reguladoras de la protein quinasa dependiente de cAMP o PKA, implicada en la señalización por cAMP en las células.
0.18	1	2,36	P12849 KAP1_MOUSE	cAMP-dependent protein kinase type I-beta regulatory subunit GN=Prkar1b	

2.06	1	4,80	P31324 KAP3_MOUSE	cAMP-dependent protein kinase type II-beta regulatory subunit GN=Prkar2b	
3.77	3	13,19	Q01147 CREB1_MOUSE	cAMP-responsive element-binding protein 1 GN=Creb1	CRE (<i>cAMP response element</i>) es un factor de transcripción dependiente de fosforilación mediada por cAMP que estimula la transcripción una vez que se une al DNA

Tabla 12. Listado de la identificación de las proteínas diferencialmente expresadas en el ratón YG8R relacionadas con la señalización celular de GPCR y de calcio.

Se especifican el Unused Prot Score como indicador de la especificidad de la identificación, el número de péptidos que se han identificado de la proteína (P) al 95% de confianza, el porcentaje de cobertura (% Cob) de la secuencia total identificado a un 95% de confianza, código de identificación de la proteína en la base de datos SwissProt/Uniprot, nombre de la proteína y del gen y breve descripción de la función.

El ratón YG8R presenta la disminución de cuatro proteínas G. Dos subunidades tipo $G\alpha_q$, la Gna11 y la Gna14 y dos subunidades tipo $G\beta\gamma$, la Gnb1 y la Gnb2. Las cuatro proteínas G deficientes señalizan a través de la activación de la PLC3 β , que forma los segundos mensajeros, DAG o IP3, que modulan el efecto de la PKC y la movilización del Ca²⁺ intracelular. A lo que hay que añadir que el ratón YG8R presenta también la disminución en la isoforma PLC3 β y en las PKC α y PKC β , que son los efectores de la vía de señalización, indicando un defecto generalizado de la vía de señalización de los GPCR, a través de $G\alpha_q$ y $G\beta\gamma$ /PLC3 β /DAG-IP3/PKC, desde las proteínas G acopladas al receptor GPCR hasta los efectores implicados en la señalización por calcio.

Con respecto a la vía de señalización por proteína Gs/AC/cAMP/PKA el ratón YG8R presenta la disminución de 3 isoformas de las subunidades reguladoras de la PKA. Dos de ellas son subunidades reguladoras tipo I, la PKAR1A y la PKAR1B, y la otra es subunidad reguladora tipo II, la PKAR2B. La PKA, en estado inactivo, es un tetrámero compuesto de dos subunidades reguladoras (R) y dos catalíticas (C). Las subunidades reguladoras se encargan de inactivar a la PKA para el siguiente estímulo, por lo que un defecto en las subunidades reguladoras implica un defecto en la correcta activación de la PKA. A ello hay que añadir que el ratón YG8R presenta también la disminución en el factor de transcripción CREB1. Este factor de transcripción se fosforila por PKA, se une al elemento de respuesta al cAMP e induce la transcripción de genes en respuesta a la estimulación de la vía cAMP. Indicando un defecto generalizado de la vía de señalización de los GPCR, a través de Gs/AC/cAMP/PKA, desde los efectores hasta la modulación de la transcripción.

En su conjunto, el déficit primario de frataxina está implicado en la desensibilización del sistema de señalización acoplado a proteína G, debido a defectos en cuatro proteínas G y en cuatro de los efectores de la vía, como son PLC β , PKC, PKA y CREB, llevan a una situación fisiopatológica con un impedimento grave de la señalización celular. La desensibilización de la cascada se agrava por el defecto de PKA y PKC, que además de ser efectoras de la vía de señalización, también están encargadas de activar quinasas para que fosforilen al receptor acoplado a proteína G e inactivarlo

3.3. La falta de frataxina causa el déficit de proteínas con actividad dependiente del calcio

Unused Prot Score	P (95%)	% Cob (95%)	Swissprot accesion / Uniprot ID	Nombre proteína / Nombre gen	Descripción función en Uniprot
1.76	2	24,16	Q9D6P8 CALL3_MOUSE	Calmodulin-like protein 3 GN=Calml3	Proteína de unión a calcio
2.52	2	11,51	P63328 PP2BA_MOUSE	Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit alpha isoform GN=Ppp3ca	Fosfatasa estimulada por calmodulina, dependiente de calcio. Implicada en la activación de calcineurina por calmodulina
4.74	3	15,28	O08529 CAN2_MOUSE	Calpain-2 catalytic subunit GN=Capn2	Proteasa regulada por calcio implicada en la proteólisis de sustratos implicados en la remodelación del citoesqueleto

Tabla 13. Listado de la identificación de las proteínas diferencialmente expresadas en el ratón YG8R relacionadas con la señalización celular por calcio.

Se especifican el Unused Prot Score como indicador de la especificidad de la identificación, el número de péptidos que se han identificado de la proteína (P) al 95% de confianza, el porcentaje de cobertura (% Cob) de la secuencia total identificado a un 95% de confianza, código de identificación de la proteína en la base de datos SwissProt/Uniprot, nombre de la proteína y del gen y breve descripción de la función.

El ratón YG8R presenta la disminución de las dos proteínas del sistema calmodulina/calcineurina que media la señalización por Ca^{2+} . La CALML3 o calmodulina es el prototipo de sensor de Ca^{2+} , es una proteína multifuncional que interacciona de manera calcio dependiente con diferentes dianas nucleares como factores de transcripción o enzimas. La PPP3ca o Calna o calcineurina alfa, es la subunidad catalítica que contiene el sitio de unión a la calmodulina y responde defosforilando a otras proteínas. La calcineurina regula tres rutas transcripcionales NFAT, TORC y MEF-2 y puede modular la expresión génica por regular el Ca^{2+} intracelular actuando sobre el RE. Desempeña un papel fundamental en la plasticidad sináptica y la memoria.

El ratón YG8R presenta la disminución de la CAPN2 o calpaína, una proteasa de cisteínas Ca^{2+} dependiente, fuertemente implicada en las fases tardías de la degeneración Walleriana por llevar a cabo la degradación del citoesqueleto.

En su conjunto, los resultados del estudio proteómico en el ganglio dorsal del ratón YG8R han confirmado un gran defecto en la presencia de proteínas, sugiriendo que el déficit de frataxina está implicado en un defecto de la síntesis proteica. Los resultados han confirmado en el ratón YG8R la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo, por defectos en proteínas de la CTE y de sistemas antioxidantes. Los resultados han permitido descubrir nuevas vías alteradas en el déficit de frataxina, como la señalización por GPCR, que implica defectos en la señalización por Ca^{2+} y en la transcripción génica que median las respuestas neuroprotectoras o la funcionalidad sináptica. Además aporta nuevos mecanismos moleculares de estudio y posibles dianas terapéuticas en el déficit de frataxina. También ha confirmado defectos en proteínas dependientes de Ca^{2+} como el sistema calmodulina/calcineurina y la calpaína.

4. Nuevas aproximaciones terapéuticas para el rescate axonal en el déficit de frataxina

Una de las alteraciones más relevantes que se producen en el cultivo *in vitro* de las neuronas sensitivas del ratón YG8R debido a la falta de frataxina es la distrofia axonal. Los axones sufren hinchazones axonales característicos que progresan hasta la formación de esferoides axonales, indicadores de un proceso de neurodegeneración axonal. En este trabajo hemos demostrado que uno de los procesos que desencadenan la aparición de estos esferoides es la desregulación del Ca^{2+} debida al déficit de frataxina. Otro proceso que hemos visto alterado es la señalización de las vías acopladas a los GPCR, que junto con la disminución en el mecanismo del SOCE, pueden promover defectos en la señalización por Ca^{2+} y defectos en las respuestas de neuroprotección y neuroplasticidad, promoviendo el daño axonal. Con todo ello diseñamos dos aproximaciones terapéuticas con la finalidad de modular los niveles de Ca^{2+} intraaxonales y actuar sobre la formación de estos esferoides axonales y por tanto la distrofia axonal que se produce ante el déficit de frataxina. La primera estrategia terapéutica se basa en la disminución de los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ con quelantes y en la disminución de la actividad calpaína con un inhibidor de metaloproteasas para analizar si revierten la formación de esferoides axonales. La segunda estrategia terapéutica se basa en inhibidores de fosfodiesterasas (PDE) para aumentar los niveles de cAMP y cGMP y analizar si modulan los niveles de Ca^{2+} intracelulares y si revierten la formación de esferoides axonales.

4.1. Modulación del Ca^{2+} citosólico y de la actividad calpaína y su implicación en el proceso de neurodegeneración

Los niveles de Ca^{2+} están muy implicados en los mecanismos moleculares de la degeneración axonal tipo Walleriana, *dying-back* o modelo focal. Se ha visto que los niveles de Ca^{2+} presentan aumentos locales en los puntos en los que se forman los esferoides axonales, participando en la activación de la calpaína que ejecuta la proteólisis del citoesqueleto [160]. La calpaína es una proteasa de cisteínas que se activa por Ca^{2+} y que efectúa su acción catalítica sobre el citoesqueleto (proteínas asociadas a microtúbulos como TAU y MAP2, espectrina y tubulina, pero no sobre neurofilamentos). Este tipo de proteasas son importantes para la homeostasis del crecimiento, la remodelación y la muerte celular.

El análisis del perfil proteómico en nuestro modelo murino FRDA nos indicó una disminución en los niveles de calpaína, sin embargo quisimos confirmar si el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ observado en las neuronas YG8R participaba en la formación de los esferoides axonales a través de la activación de la calpaína. Para responder a esta pregunta se realizó el estudio de la actividad calpaína y de la formación de esferoides axonales en condiciones basales y con tratamientos que modulan las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la actividad calpaína. Los tratamientos elegidos se basaron en la quelación de Ca^{2+} extracelular con EGTA, la quelación de Ca^{2+} intracelular con BAPTA, la inhibición de la

calpaína con un inhibidor de metaloproteasas y un exceso de Ca^{2+} extracelular con CaCl_2 . Los tratamientos se realizaron sobre las neuronas sensitivas en cultivo primario de ganglio dorsal de ratones de 24 meses de edad.

4.1.1. El déficit de frataxina presenta una disminución de la actividad calpaína

Primero realizamos el estudio de la actividad calpaína de las neuronas sensitivas del modelo FRDA en condiciones basales a los 3 *div* con la sonda CMAC, t-BOC-Leu-Met. Esta sonda es un sustrato tipo peptidasa específico para calpaína, de forma que al sufrir el corte proteolítico de la calpaína el producto t-BOC emite fluorescencia azul a 430 nm proporcionalmente a la actividad calpaína. La medida de la actividad calpaína se realizó por microscopía confocal en cámara con control de CO_2 y temperatura. Para visualizar el estado de la mitocondria durante la medida se marcó con la sonda Mitotracker deep red.

La cuantificación de la fluorescencia t-BOC, en condiciones basales, reveló que las neuronas sensitivas deficientes en frataxina muestran menor actividad calpaína, estadísticamente significativa con respecto al control C57BL/6J (**Figura 57A**) y de forma proporcional a la cantidad de frataxina. La falta de actividad calpaína, a pesar del incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, en las neuronas deficientes en frataxina, puede ser debida a la disminución de la proteína CAPN2 o calpaína como indican los resultados de la proteómica del ganglio dorsal en el apartado 3.3 de resultados.

Las imágenes de microscopía confocal muestran la fluorescencia azul producida por la actividad calpaína y el estado de la red mitocondrial en las neuritas (**Figura 57B**). Observamos que en los ratones deficientes en frataxina aparecen evidentes acumulaciones de la mitocondria a lo largo de las neuritas, indicando una incorrecta distribución mitocondrial y la formación de esferoides axonales.

El estudio de la actividad calpaína en las neuronas sensitivas del modelo murino FRDA nos ha permitido confirmar que en el déficit de frataxina hay una menor actividad de la calpaína, posiblemente porque los niveles de la proteína calpaína están reducidos. La presencia de esferoides axonales en las neuronas deficientes que presentan reducidos niveles de actividad calpaína nos indica que la actividad calpaína no está participando en la distrofia axonal que sufren. Este defecto en la activación de calpaína es coincidente con la falta de rotura del citoesqueleto y desintegración de las neuritas deficientes en frataxina que hemos observado por microscopía.

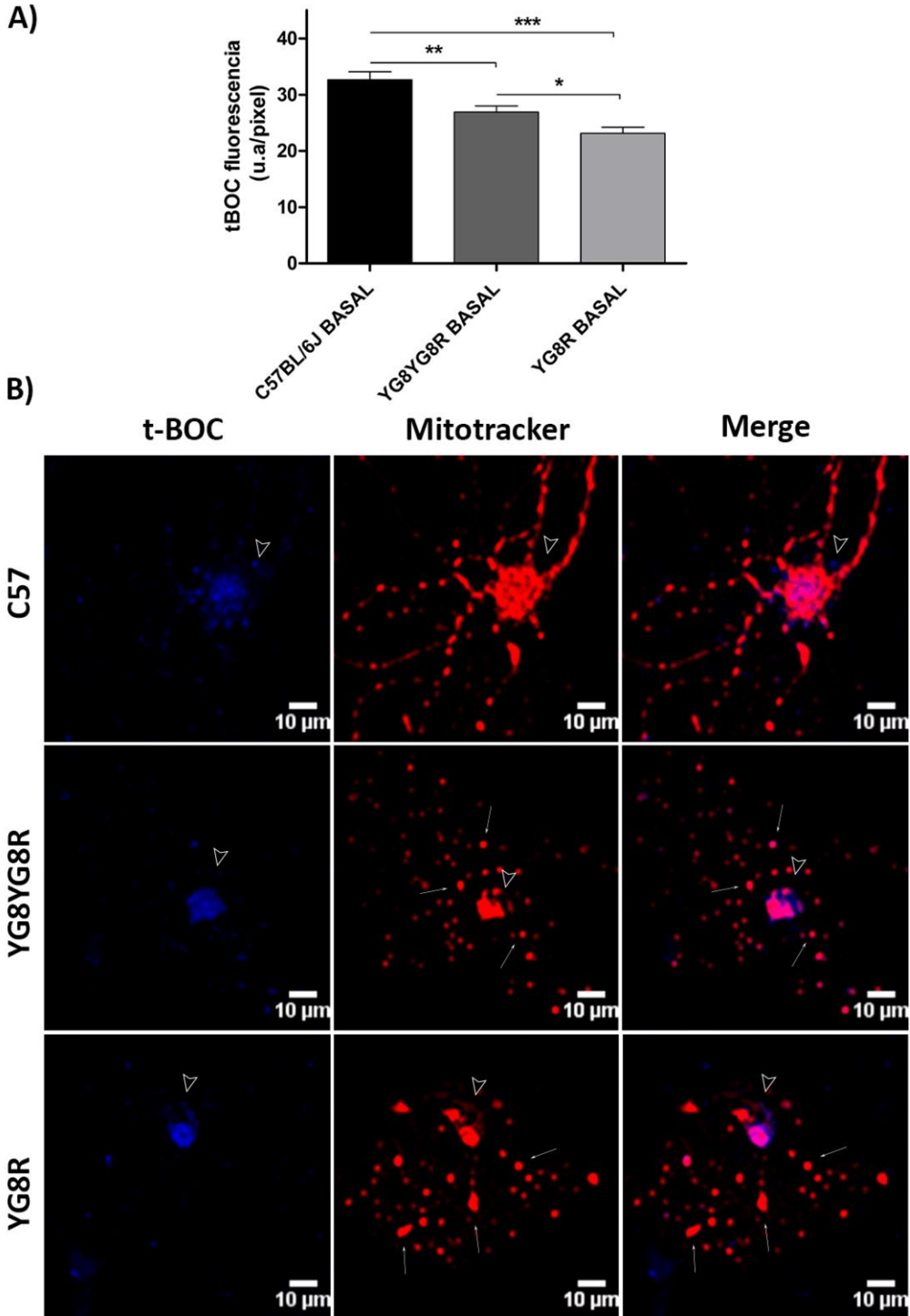


Figura 57. Detección de la actividad calpaína en neurona sensitiva in vivo del modelo murino FRDA.

A) Cuantificación de la fluorescencia de la sonda t-BOC en condiciones basales que indica la actividad calpaína de las neuronas sensitivas de cada uno de los genotipos estudiados. **B)** Las imágenes de microscopía muestran la fluorescencia del producto enzimático de la calpaína en azul y la fluorescencia del marcaje mitocondrial con mitotracker deep en rojo. Se observa la formación de esferoides axonales con acumulación mitocondrial en el ratón deficiente YG8R. Las cabezas de flecha [∇] indican los somas neuronales y las flechas [\uparrow] indican los esferoides axonales con mitocondria acumulada en las neuritas. Los datos representan la media \pm S.E.M de tres repeticiones experimentales con un total de 63, 110 y 106 neuronas medidas para C57BL/6J, YG8YG8R e YG8R, respectivamente. Análisis ANOVA unifactorial por genotipo y nivel de significación * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

4.1.2. La quelación del calcio y la inhibición enzimática de la calpaína regulan su actividad proteolítica

Aunque la actividad calpaína estaba reducida, era interesante confirmar si esta actividad era dependiente de la $[Ca^{2+}]_i$. Para ello las neuronas sensitivas de un cultivo primario de 2 *div* se trataron durante 24 horas con los moduladores del Ca^{2+} EGTA, BAPTA y $CaCl_2$ y con el inhibidor o-fenantrolina. Tras el tratamiento a los 3 *div* se realizó la medida de la actividad calpaína con la sonda CMAC, t-BOC-Leu-Met, igual que para la condición basal explicada en el apartado anterior. Los tratamientos con los quelantes de Ca^{2+} , EGTA y BAPTA y con la o-fenantrolina se aplicaron en el genotipo deficiente YG8R. El tratamiento con $CaCl_2$ se aplicó en el control C57BL/6J.

La cuantificación de la fluorescencia t-BOC reveló que las neuronas sensitivas deficientes en frataxina del ratón YG8R, tras la aplicación de los tres tratamientos, muestran menor actividad calpaína, con respecto a su condición basal (**Figura 58A**). Esta disminución de la actividad calpaína en los tres tratamientos indica que tanto la quelación del Ca^{2+} extracelular con EGTA, como la quelación del Ca^{2+} intracelular con BAPTA, como la inhibición directa de la calpaína con o-fenantrolina, causan la disminución de la actividad calpaína. Por lo tanto la actividad calpaína, en el ratón YG8R, es dependiente de la $[Ca^{2+}]_i$.

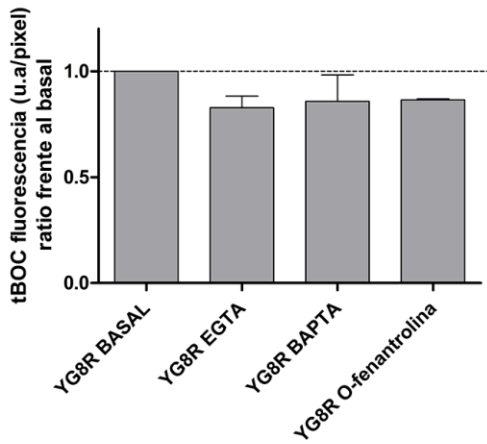
La cuantificación de la fluorescencia t-BOC reveló que las neuronas sensitivas del control C57BL/6J, tras la aplicación de un exceso de Ca^{2+} extracelular, no muestran una mayor actividad calpaína, con respecto a su condición basal (**Figura 58B**). Éste hecho indica que los sistemas celulares implicados en la homeostasis del Ca^{2+} , como el RE, la mitocondria y la bomba PMCA de la MP, funcionan correctamente en las neuronas control, y a pesar de sufrir un exceso de Ca^{2+} extracelular son capaces de mantener la $[Ca^{2+}]_i$ en niveles que no activan a la calpaína.

Las imágenes de microscopía confocal muestran la fluorescencia azul producida por la actividad calpaína y el estado de la red mitocondrial en las neuritas (**Figura 58C y 58D**). Observamos que en el ratón deficiente YG8R tratado con EGTA, BAPTA y o-fenantrolina la actividad calpaína es muy débil y que la distribución mitocondrial a lo largo de la neurita no presenta acumulaciones tan evidentes como en la condición basal (**Figura 58C**). Posiblemente los tratamientos están atenuando el proceso patológico en el ratón YG8R bien por la disminución de la $[Ca^{2+}]_i$ o bien por la inhibición de la actividad calpaína.

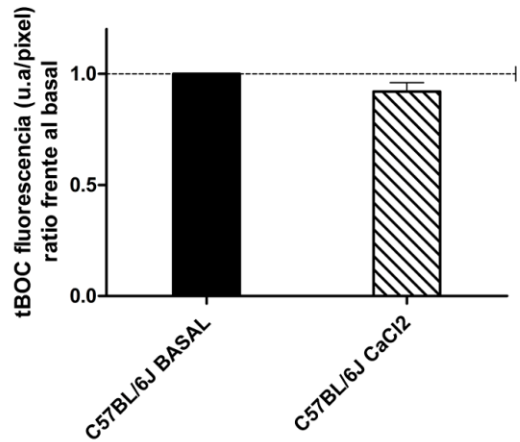
También observamos que en el ratón control C57BL/6J tratado con CaCl_2 , a pesar de que la actividad calpaína no aumenta significativamente con respecto al control basal presenta una distribución mitocondrial a lo largo de la neurita alterada en forma de acumulaciones evidentes de mitocondria (**Figura 58D**). Esta evidencia confirma que el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ participa en la formación de los esferoides aunque no lo hace a través de la activación de la calpaína.

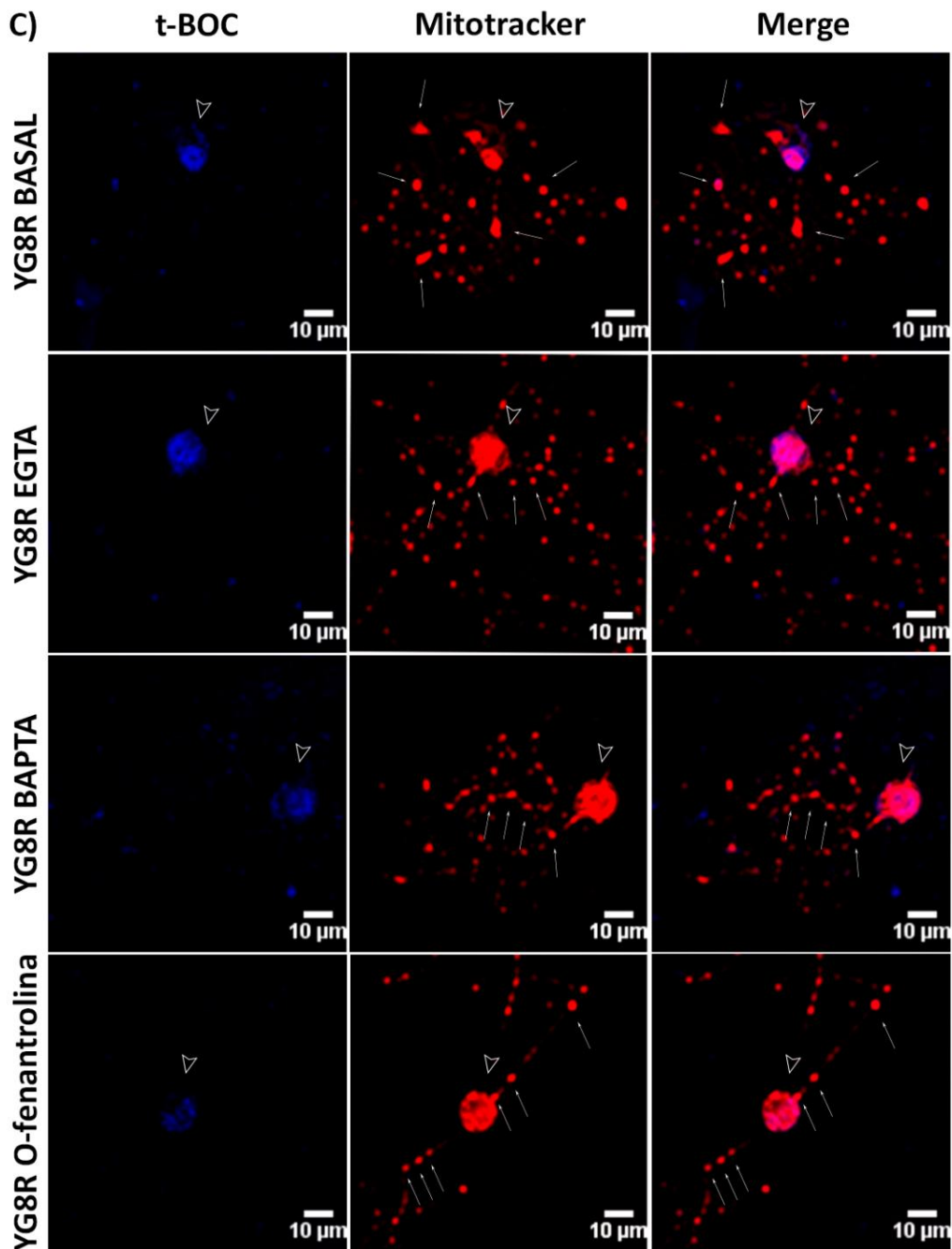
Por lo tanto, la formación de esferoides axonales en los ratones deficientes en frataxina, que presentan una $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aumentada pero una actividad calpaína disminuida, es debida al aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Mientras que en el ratón control C57BL/6J tratado con CaCl_2 , donde no se observa un aumento de la actividad calpaína, pero sí se da la formación de esferoides, descarta el papel de la calpaína en este proceso. En el modelo FRDA, el hecho de que elevados niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ no activen a la calpaína sugiere que otra vía está implicada en las alteraciones del citoesqueleto que observamos en el ratón deficiente YG8R, siendo el estrés oxidativo un buen candidato para ello.

A)



B)





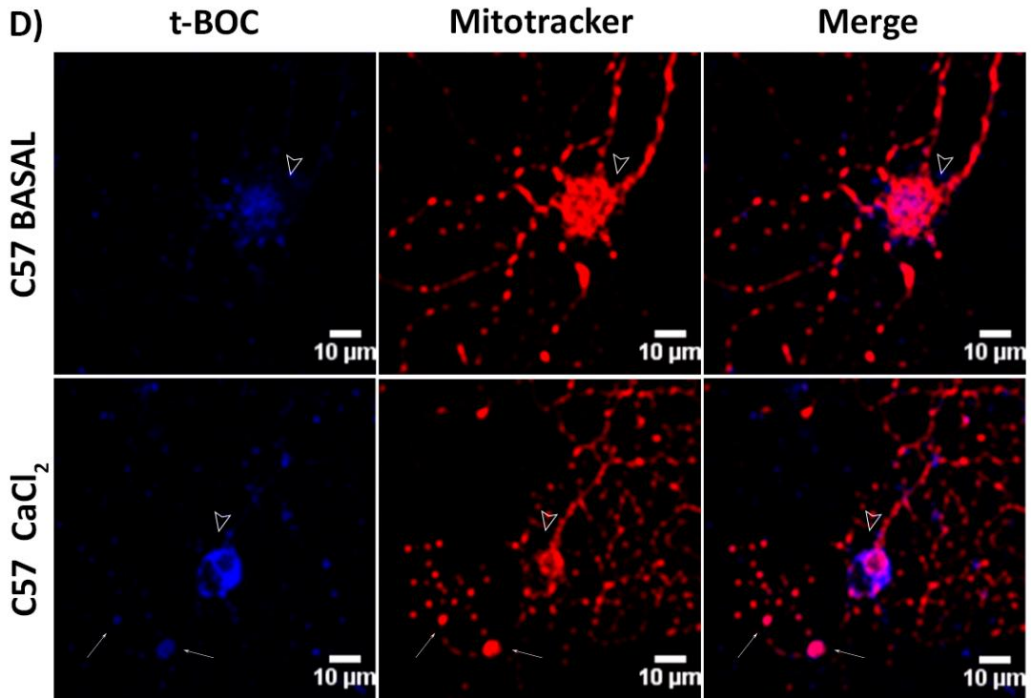


Figura 58. Detección de la actividad calpaína en neuronas sensitivas in vivo del modelo murino FRDA con tratamientos moduladores de su actividad.

A-B) Cuantificación de la fluorescencia de la sonda t-BOC que indica la actividad calpaína de las neuronas sensitivas en cada uno de los tratamientos aplicados. **C, D)** Las imágenes de microscopía muestran la fluorescencia del producto enzimático de la calpaína en azul y la fluorescencia del marcaje mitocondrial con mitotracker deep en rojo. Se observa menor acumulación mitocondrial en los tratamientos EGTA, BAPTA y o-fenantrolina, **(C)**. Se observa la formación de esferoides axonales con acumulación mitocondrial en el tratamiento con CaCl₂ **(D)**. Las cabezas de flecha [∇] indican los somas neuronales y las flechas [↑] indican los esferoides axonales con mitocondria acumulada en las neuritas. Los datos representan la media ± S.E.M de tres repeticiones experimentales con un total de 46, 48, 39 y 73 neuronas medidas para el YG8R tratado con EGTA, BAPTA, O-fenantrolina y control C57BL/6J tratado con CaCl₂, respectivamente. Análisis ANOVA unifactorial por genotipo.

4.1.3. La quelación del calcio y la inhibición enzimática de la calpaína revierten la distrofia axonal en el déficit de frataxina

Por último estudiamos la efectividad de los tratamientos sobre el proceso de neurodegeneración axonal. Para ello se realizó el estudio de la morfología mitocondrial. Una vez confirmado que los tratamientos durante 24 horas eran compatibles con la viabilidad neuronal se decidió aumentar el tiempo de tratamiento para obtener un mayor efecto en este estudio. Los tratamientos se aplicaron desde el momento de la siembra y durante 4 *div*. Los tratamientos con EGTA, BAPTA y o-fenantrolina se aplicaron en el genotipo deficiente YG8R y el tratamiento con CaCl₂ se aplicó en el genotipo control C57BL/6J. A los 4 *div* se marcó la mitocondria con la sonda mitotracker deep red y se detectaron las neuronas con β -tubulinaIII mediante IFI. La descripción de los parámetros morfológicos de la mitocondria se realizó en la zona proximal de la neurita, desde que sale del soma hasta la primera bifurcación con el macro "mito-morphology". Se analizaron los parámetros de número de mitocondrias/100 μ m, el % de área celular ocupada por la mitocondria, el índice de elongación, el índice de interconectividad y la hinchazón mitocondrial.

Las imágenes de microscopía confocal de la **Figura 59** muestran en el ratón YG8R, en condiciones basales, una alteración patológica evidente con focos que acumulan o retienen una gran cantidad de mitocondria. Observamos en el ratón YG8R tratado con BAPTA y con o-fenantrolina, que estas alteraciones axonales son menos evidentes, la mitocondria aparece menos retenida y con una distribución más homogénea a lo largo de la red neurítica. El control C57BL/6J tratado con CaCl₂ presenta enormes hinchazones axonales en la zona proximal del soma neuronal en las que se retiene gran cantidad de mitocondria. El tratamiento con EGTA durante 4 *div* no permitió la supervivencia neuronal, por lo que se descarta como posible tratamiento aplicable durante un período de tiempo prolongado.

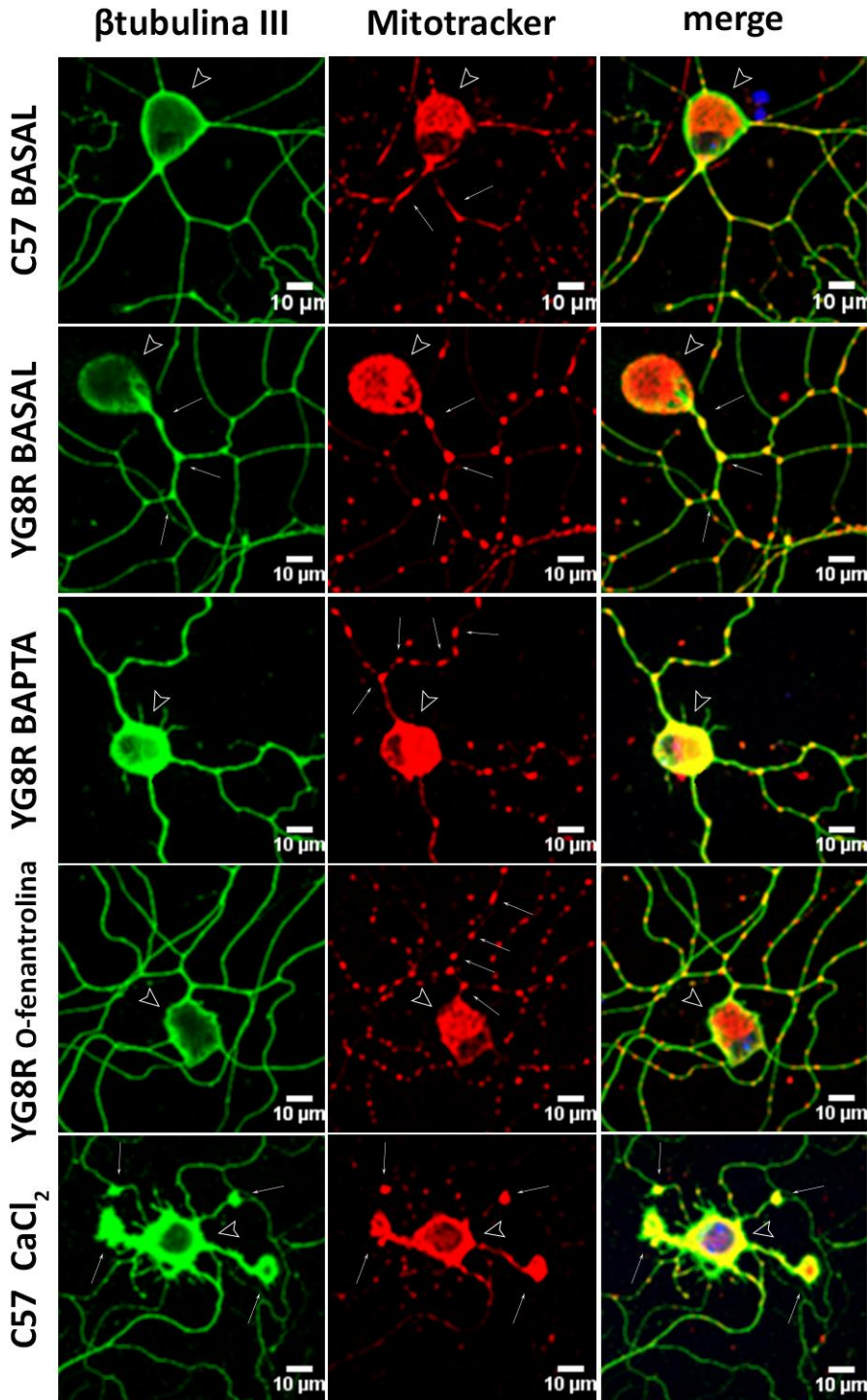


Figura 59. Patrón de la red neurítica y mitocondrial en neuronas sensitivas del modelo murino FRDA tratadas con moduladores del calcio y de la actividad calpaína.

Las imágenes de microscopía confocal muestran la fluorescencia del marcaje mitocondrial con mitotracker deep en rojo y la fluorescencia del marcaje neuronal con β -tubulina III en verde. Las imágenes son representativas de la morfología mitocondrial y del citoesqueleto de las neuronas sensitivas del ganglio dorsal. Se observa la formación de esferoides axonales con acumulación mitocondrial en el ratón deficiente YG8R y la reversión en los tratamientos con BAPTA y O-fenantrolina. También se observan las alteraciones excesivas en el control C57BL/6J tratado con CaCl_2 . Las cabezas de flecha [∇] indican los somas neuronales y las flechas [\uparrow] indican la distribución mitocondrial a lo largo de las neuritas.

La cuantificación de los parámetros mitocondriales en condiciones basales a los 4 *div* confirman los resultados previos en condiciones basales a los 5 *div* descritos en el apartado 2.4.5 de resultados (**Figura 51**). El déficit de frataxina, en condiciones basales, provoca un aumento del número de mitocondrias que ocupan una mayor superficie de la neurita, una disminución del índice de elongación, un aumento de la interconectividad y un aumento del hinchazón de la mitocondria, de forma significativa con respecto al control C57BL/6J (**Figuras 60A-60F**). Estos resultados indican que las mitocondrias deficientes en frataxina son más redondas, están más hinchadas y aumentan su interconectividad.

Las neuronas sensitivas deficientes en frataxina YG8R tratadas con BAPTA y o-fenantrolina muestran una reversión de las alteraciones en la morfología mitocondrial hasta alcanzar los niveles del control C57BL/6J en condición basal (**Figuras 60A-60F**). Los tratamientos con BAPTA y o-fenantrolina disminuyen el porcentaje de área axonal que ocupa la mitocondria, aumentan el índice de elongación, disminuyen el índice de interconectividad y disminuyen el hinchazón axonal hasta los niveles del control C57BL/6J. Además el tratamiento con o-fenantrolina muestra un incremento en el número de mitocondrias mientras que el tratamiento con BAPTA parece no afectar este parámetro.

Las neuronas sensitivas control del C57BL/6J tratadas con CaCl_2 muestran las mismas alteraciones en la morfología mitocondrial que se observan en el ratón YG8R. El control con exceso de Ca^{2+} extracelular presenta un aumento del número de mitocondrias que ocupan una mayor superficie de la neurita, una disminución del índice de elongación, un aumento de la interconectividad y un aumento del hinchazón de la mitocondria, de forma significativa con respecto al control C57BL/6J (**Figuras 60A-60F**). El mismo resultado obtuvimos en el control C57BL/6J tratado con el ionóforo A23, como se describe en la **Figura 51** en el apartado 2.4.5 de resultados, confirmando que las alteraciones en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ son las que mejor reproducen los cambios morfológicos mitocondriales que sufre el ratón YG8R.

La frecuencia de los índices de hinchazón de las mitocondrias (**Figura 60F**) indica que el control C57BL/6J presenta mitocondrias con un índice de hinchazón menor a 5, sin embargo las mitocondrias del ratón YG8R llegan a presentar índices de hinchazón mitocondriales de hasta casi 10, es decir el doble. Observamos que el tratamiento con BAPTA disminuye este índice hasta 8, pero es la o-fenantrolina la que lo disminuye hasta 2.

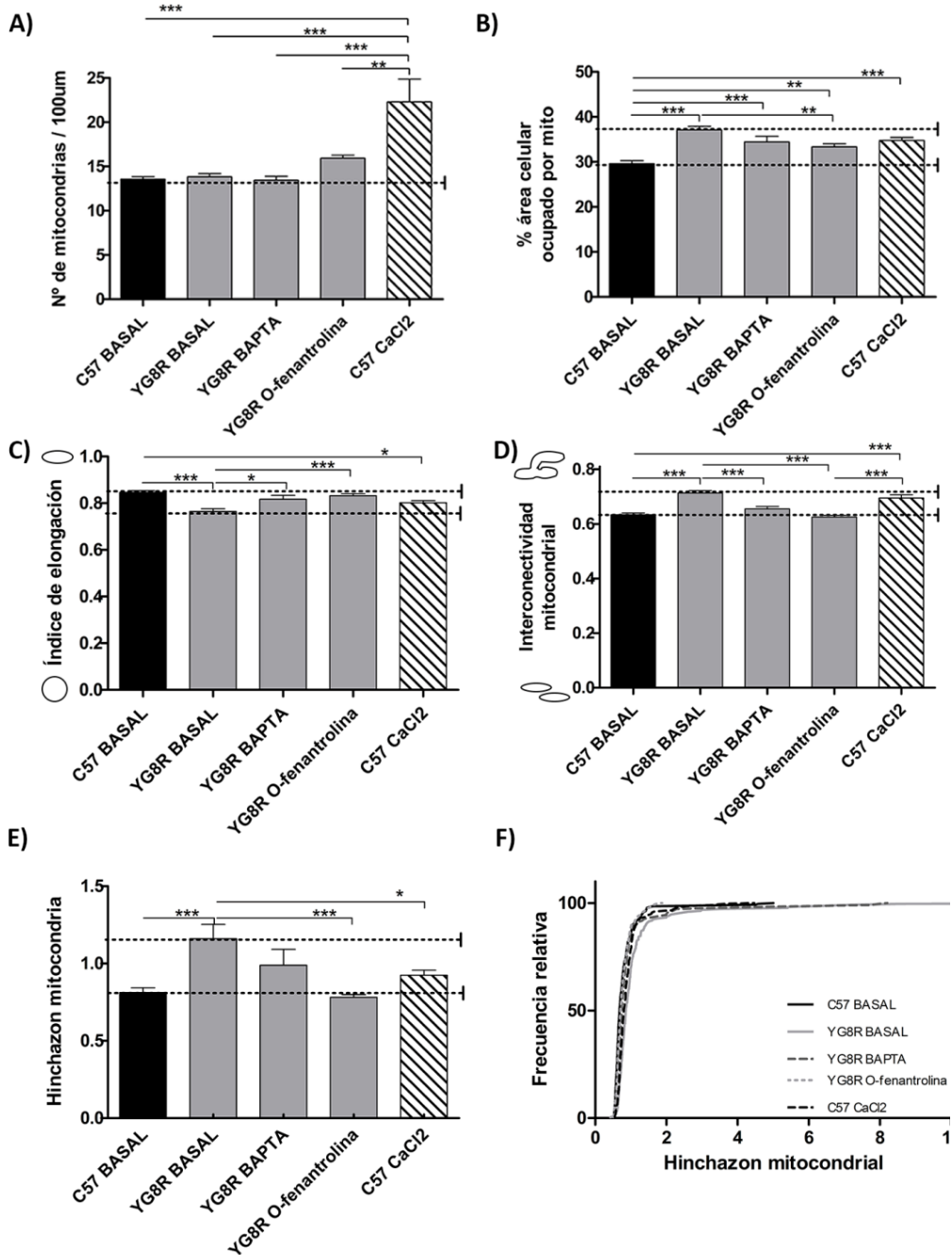


Figura 60. Cuantificación de los descriptores de la morfología mitocondrial en neuronas sensibles del modelo murino FRDA tratadas con moduladores del calcio y de la actividad calpaína.

A) Número de mitocondrias por 100 µm de neurita. **B)** Porcentaje de la superficie axonal ocupada por la mitocondria. **C)** Índice de elongación, corresponde a la media de la inversa de la circularidad de las mitocondrias analizadas. **D)** Interconectividad mitocondrial, corresponde a la media del ratio área/perímetro de las mitocondrias analizadas. **E)** Hinchazón de la mitocondria, corresponde al índice de

interconectividad normalizado con el índice de elongación o circularidad para medir el hinchamiento de la mitocondria. **F)** Distribución de los tamaños de la hinchazón mitocondrial. Los datos representan la media \pm S.E.M de tres repeticiones experimentales con un total de 93, 99, 40, 87 y 83 neuronas medidas para C57BL/6J basal, YG8R basal, YG8R tratado con BAPTA, YG8R tratado con o-fenantrolina y control C57BL/ tratado con CaCl_2 , respectivamente. Análisis ANOVA unifactorial por genotipo y nivel de significación * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

Los resultados confirman que la formación de esferoides revierte significativamente con la disminución de los niveles de calcio intraaxonales y con la inhibición de metaloproteasa, y que ambos tratamientos se acompañan de una disminución en la actividad calpaína. Los resultados muestran que la reversión de la distrofia axonal es más efectiva con el inhibidor de metaloproteasas, o-fenantrolina, que con la quelación del calcio intracelular. Una posibilidad es que la o-fenantrolina, al ser un inhibidor de metaloproteasas dependientes de cationes divalentes esté actuando sobre otras enzimas que intervengan en el proceso de distrofia axonal. Además la fenantrolina es un quelante del Fe^{2+} y no hay que olvidar que se ha descrito tanto en pacientes como en muchos modelos que el déficit de frataxina incrementa los niveles de hierro en la mitocondria. Por tanto, una quelación de este hierro podría favorecer la mejoría de se observa bajo este tratamiento en las neuronas sensitivas deficientes en frataxina.

4.2. Modulación del cAMP, cGMP y los niveles de calcio citosólicos y su implicación en el proceso de neurodegeneración

El ratón YG8R presenta déficits proteicos que afectan tanto a la vía AC/cAMP/ERK implicada en la activación transcripcional que media el efecto neuroprotector, neurotrófico y crecimiento neurítico de PACAP/PAC1R, como a la vía PLC/DAG-IP3 implicada en la regulación de cascadas de señalización, de la señalización celular por Ca^{2+} y de la expresión génica por Ca^{2+} que median la plasticidad y transmisión sináptica, el efecto neuroprotector y la neurogénesis de PACAP/PAC1R. Un defecto en estas vías de señalización significa que las neuronas sensitivas deficientes en frataxina tienen menos respuesta neuroprotectora frente al estrés oxidativo, menos crecimiento neurítico y menos plasticidad sináptica, repercutiendo directamente en la funcionalidad y en la supervivencia neuronal. Por ello decidimos activar farmacológicamente estas vías de señalización.

La señalización por cAMP está fuertemente relacionada con otros dos segundos mensajeros, el cGMP y el Ca^{2+} . Las intrincadas regulaciones entre los tres mensajeros contribuyen a potenciar el número de estrategias que codifican la señalización celular convirtiéndose en una única vía de señalización [161, 162]. Las ondas de Ca^{2+} , que aumentan el Ca^{2+} citosólico, provocan el aumento citosólico de cAMP y cGMP, que deben disminuir los niveles citosólicos de Ca^{2+} y restaurar los niveles basales. De esta forma el aumento de cAMP y cGMP, a través de la disminución del Ca^{2+} citosólico, induce la relajación del músculo liso, la broncodilatación y la vasodilatación [163, 164]. El cGMP disminuye los niveles de Ca^{2+} citosólico a través de la activación de la PKG, que fosforila a la PLB3 y la inhibe, disminuyendo la generación de IP3 y la

movilización del Ca^{2+} . El cAMP, sin embargo, puede tener un efecto variable sobre los niveles de Ca^{2+} citosólicos. El cAMP, a través de la activación de PKA, puede modular la liberación de Ca^{2+} desde los almacenes intracelulares del RE a través de la regulación de los receptores IP3 y rianodina, pero también puede eliminarlo a través de la modulación de bombas del Ca^{2+} como la SERCA del RE y la PMCA de la MP, disminuyendo los niveles de Ca^{2+} citosólico [162].

Para comprobar si la señalización por cAMP y cGMP podía estar implicada en la fisiopatología que muestran las neuronas sensitivas deficientes en fraxina, se eligieron los inhibidores de fosfodiesterasa (PDE, *phosphodiesterase*) como tratamiento farmacológico. Los inhibidores de PDE bloquean la degradación de los nucleótidos cíclicos, cAMP y cGMP, aumentando sus concentraciones celulares y actuando sobre las $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

La superfamilia de PDE se comprende de once genes, PDE1-PDE11, que se diferencian en sus funciones celulares, afinidades por cAMP y cGMP, sus propiedades catalíticas, sus respuestas a activadores específicos y en sus mecanismos de regulación. Los inhibidores de PDE se utilizan clínicamente en el tratamiento de la desregulación fisiopatológica de la señalización de los nucleótidos cíclicos (cAMP y cGMP) en muchos trastornos como disfunción eréctil, hipertensión pulmonar, fallo cardíaco refractario agudo, claudicación intermitente y enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Nuevas aplicaciones farmacéuticas de los inhibidores de PDE en enfermedades neurodegenerativas están en fases clínicas, como el resveratrol en fase II para la enfermedad de Alzheimer y la intolerancia a la glucosa, el rolipram en fase I para la depresión y la enfermedad de Huntington y el sildenafil en fase I para la distrofia muscular de Duchenne, en fase II para la vasculopatía cardíaca, en fase III para el fallo cardíaco, diabetes e intolerancia a la glucosa y fase IV para la esquizofrenia [165].

Los tratamientos elegidos se basaron en la inhibición selectiva de PDE4 con rolipram, la inhibición selectiva de PDE5 con sildenafil y la inhibición selectiva de PDE1 con nicardipino.

El rolipram es un inhibidor específico de la PDE4, que presenta mayor afinidad por el cAMP, por lo que aumenta los niveles citosólicos de cAMP. El rolipram promueve el crecimiento neurítico, y la regeneración axonal [166, 167]. Otro dato interesante respecto a este inhibidor es que se está estudiando su efectividad en la hipertrofia cardíaca [165], lo que sería muy útil en los pacientes de FRDA por ser ésta la primera causa de mortalidad en la FRDA.

El sildenafil es un inhibidor específico de la PDE5, con mayor afinidad por el cGMP, por lo que aumenta los niveles citosólicos de cGMP. El tratamiento con sildenafil activa la vía cGMP/PKG y se ha observado que revierte la neuropatía periférica diabética mejorando las funciones neuronales periféricas [168]. Además se ha descrito que induce neurogénesis y promueve la recuperación de la funcionalidad después de un infarto cerebral [169].

El nicardipino es un inhibidor específico de la PDE1, con la misma afinidad por el cAMP y por el cGMP, por lo que aumenta los niveles citosólicos de cAMP y cGMP por

igual. Además es un antagonista del canal tipo L de calcio selectivo de tipo II utilizado como antihipertensivo. Los individuos con tratamiento de dihidropiridinas como antihipertensivo desarrollan estadísticamente menos Parkinson, lo que indica que los antagonistas de los canales de calcio tipo L pueden tener un papel neuroprotector [67].

Los tratamientos se aplicaron en neuronas sensitivas de cultivo primario de ganglio dorsal de ratón de 22 meses de edad desde la siembra y a los 5 *div* se realizó el estudio de la $[Ca^{2+}]_i$ y de la formación de esferoides axonales en condiciones basales y tras la aplicación de los tratamientos que modulan los niveles de cAMP, cGMP o ambos al mismo tiempo.

4.2.1. El déficit de frataxina presenta un aumento de los niveles de Ca^{2+} citosólicos en los focos donde se forman los esferoides axonales

Primero realizamos el estudio de los niveles de Ca^{2+} citosólico en condiciones basales de las neuronas sensitivas del modelo FRDA a los 5 *div* con la sonda Fluo-8-AM. La utilización de esta sonda fluorescente sensible al Ca^{2+} es el ensayo recomendado para el testado de agonistas o antagonistas específicos de GPCR. La medida del Ca^{2+} citosólico se realizó por microscopía confocal en cámara con control de CO_2 y temperatura. Para visualizar el estado de la mitocondria durante la medida se marcó con la sonda Mitotracker deep red.

La cuantificación de la fluorescencia del Fluo-8-AM revela que las neuronas sensitivas deficientes en frataxina YG8YG8R e YG8R presentan niveles de Ca^{2+} citosólicos basales mucho más elevados, estadísticamente significativos con respecto al control C57BL/6J (**Figura 61A**). Las imágenes de microscopía confocal muestran que este aumento del Ca^{2+} citosólico se presenta tanto en el soma como en la red neurítica. El aumento intraaxonal del Ca^{2+} es más relevante en los puntos focales en los que se forman los esferoides axonales, como se puede apreciar por la acumulación de mitocondria y de Ca^{2+} intraaxonal (**Figura 61B**).

La medida de los niveles de Ca^{2+} citosólicos en condiciones basales con la sonda Fluo-8 AM a los 5 *div* confirman los resultados previos obtenidos en condiciones basales con la sonda Fura-2 AM a los 5 *div*, descritos en el apartado 2.4.5 de resultados. La diferencia entre las dos medidas se basa en la sonda y en la presencia o ausencia de Ca^{2+} en el medio de ensayo. La medida con Fura-2 AM se realizó en un medio libre de Ca^{2+} y la medida con Fluo-8 AM en un medio con Ca^{2+} , que valora de una forma más fisiológica los niveles de Ca^{2+} citosólicos en condiciones basales. La presencia de Ca^{2+} en el medio de ensayo nos permite confirmar de forma más evidente y significativa el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ basal que sufren las neuronas deficientes en frataxina, con respecto al control C57BL/6J.

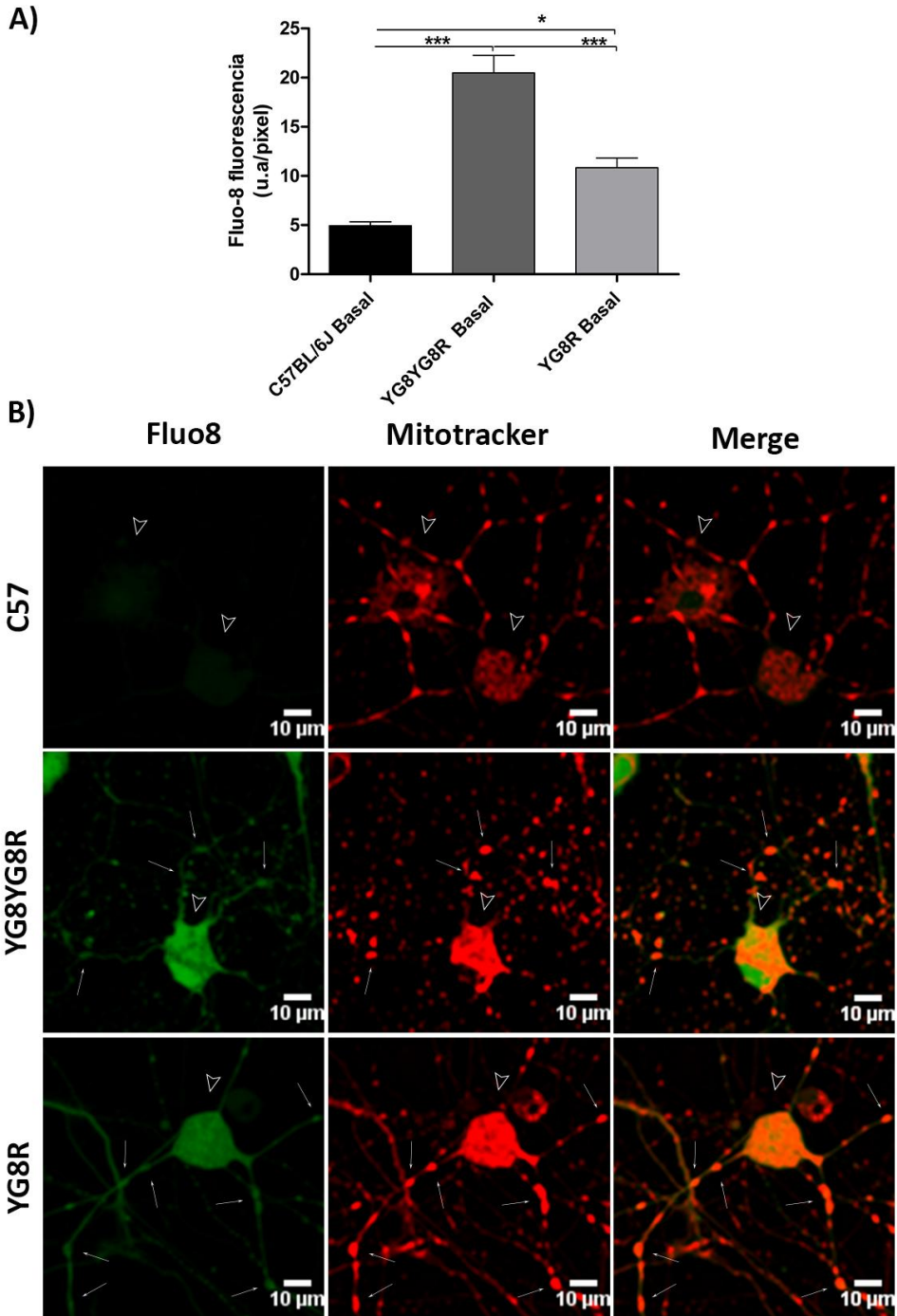


Figura 61. Detección de los niveles de Ca^{2+} citosólico en neurona sensitiva *in vivo* del modelo murino FRDA.

A) Cuantificación de la fluorescencia Fluo-8 AM asociada a la concentración de Ca^{2+} citosólico en condiciones basales. **B)** Las imágenes de microscopía muestran la fluorescencia del Fluo-8 AM en verde y

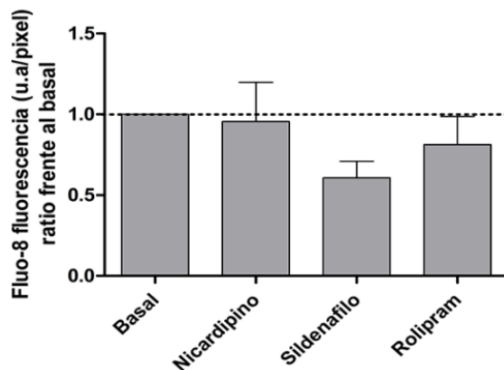
la fluorescencia del marcaje mitocondrial con mitotracker deep en rojo. Se observa el aumento del Ca^{2+} citosólico y la formación de esferoides axonales con acumulación mitocondrial y de Ca^{2+} en los ratones deficientes en frataxina. Las cabezas de flecha [∇] indican los somas neuronales y las flechas [↑] indican los esferoides axonales con Ca^{2+} y mitocondria acumulada en las neuritas. Los datos representan la media \pm S.E.M de tres repeticiones experimentales con un total de 92, 101 y 135 neuronas medidas para C57BL/6J, YG8YG8R e YG8R. Análisis ANOVA unifactorial por genotipo y nivel de significación * $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$.

4.2.2. Los inhibidores selectivos de PDE restauran los niveles de calcio citosólico en el déficit de frataxina

Después estudiamos si los niveles de Ca^{2+} citosólico se modulaban con los inhibidores de PDE. Para ello las neuronas sensitivas deficientes en frataxina YG8R se trataron desde la siembra con nicardipino, sildenafil y rolipram. A los 5 *div* se realizó la medida de los niveles de Ca^{2+} citosólico con la sonda Fluo-8-AM, de igual forma que en el apartado anterior.

La cuantificación de la fluorescencia del Fluo-8-AM revela que las neuronas sensitivas deficientes en frataxina muestran menores niveles de Ca^{2+} citosólicos cuando se tratan con nicardipino, sildenafil y rolipram con respecto a la condición basal (**Figura 62A**). Observamos que la eficacia de los tratamientos en la reducción de los niveles de Ca^{2+} es diferente. El tratamiento que más reduce los niveles de Ca^{2+} citosólicos es el sildenafil, después el rolipram y por último el nicardipino. Por lo tanto, los resultados indican que la actuación más efectiva para reducir los niveles citosólicos de Ca^{2+} es el aumento del cGMP inhibiendo la PDE5 con sildenafil. El aumento del cAMP por inhibición de la PDE4 con rolipram también es efectivo pero un poco menos que el sildenafil, posiblemente debido que el cAMP puede aumentar y disminuir el Ca^{2+} citosólico al mismo tiempo. Aunque la actuación global del aumento de cAMP que observamos en las neuronas sensitivas es la disminución de los niveles de Ca^{2+} citosólicos. Por último la actuación menos efectiva, que casi no modifica los niveles de Ca^{2+} citosólicos, es el aumento del cGMP y del cAMP inhibiendo la PDE1 junto con un bloqueo de los canales de Ca^{2+} tipo L con nicardipino. Este hecho sugiere que la inhibición de la PDE1 no es tan efectiva como la inhibición de la PDE4 o la PDE5 para aumentar los niveles de cAMP y cGMP y que los canales de Ca^{2+} tipo L no participan en el aumento del Ca^{2+} citosólico que presentan las neuronas sensitivas deficientes en frataxina.

A)



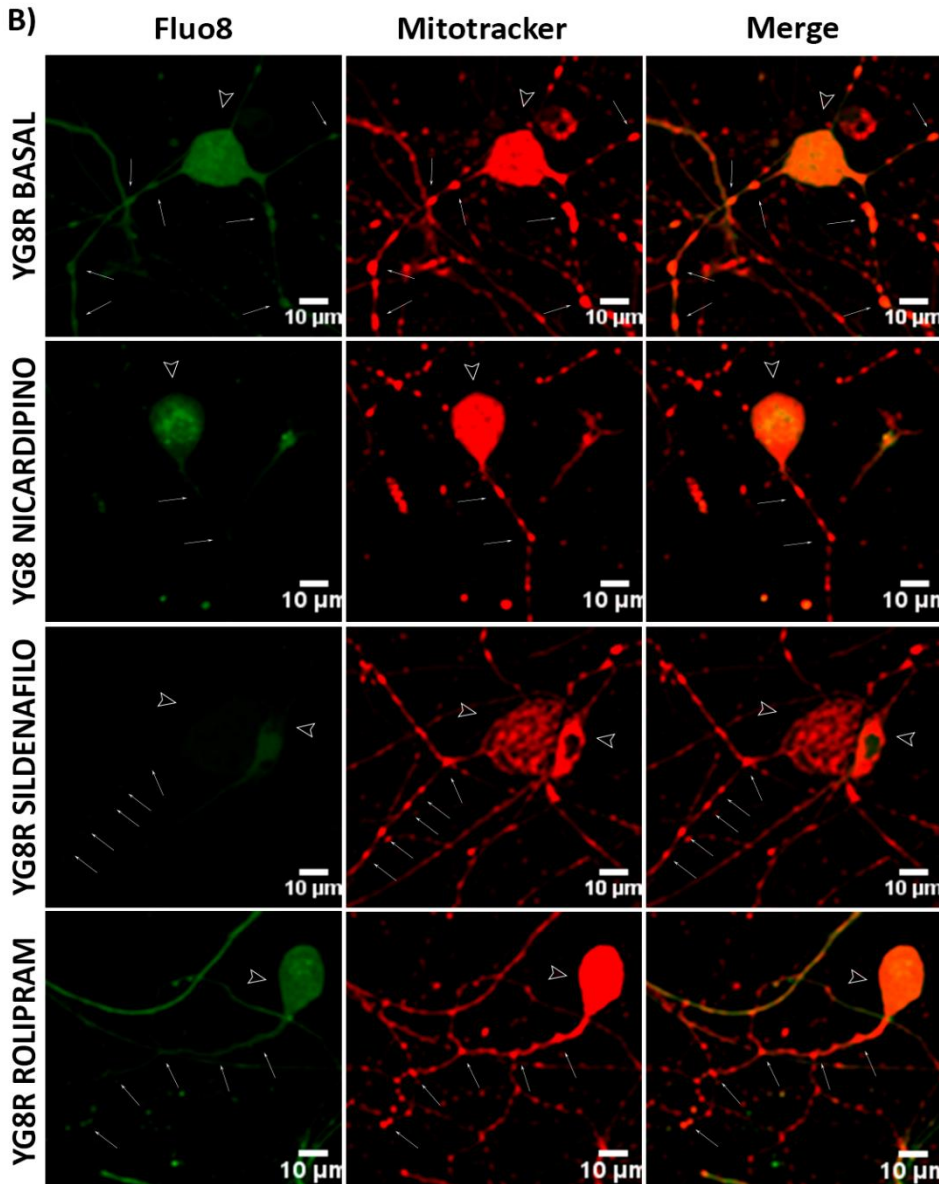


Figura 62. Detección de los niveles de Ca^{2+} citosólico en neuronas sensitivas in vivo del modelo murino FRDA con inhibidores de PDE.

A) Cuantificación de la fluorescencia Fluo-8 AM asociada a la concentración de calcio citosólico en los tratamientos. **B)** Las imágenes de microscopía muestran la fluorescencia del Fluo-8 AM en verde y la fluorescencia del marcaje mitocondrial con mitotracker deep en rojo. Se observa la disminución de los niveles de Ca^{2+} citosólico en los tratamientos. Las cabezas de flecha [∇] indican los somas neuronales y las flechas [\uparrow] indican la ausencia de esferoides axonales con Ca^{2+} y mitocondria acumulada en las neuritas. Los datos representan la media \pm S.E.M de tres repeticiones experimentales con un total de 135, 130, 131 y 108 neuronas medidas para el YG8R basal e YG8R tratado con nicardipino, sildenafilo y rolipram, respectivamente. Análisis ANOVA unifactorial por genotipo.

Las imágenes de microscopía confocal muestran la disminución de los niveles de Ca^{2+} citosólicos en las neuronas deficientes en frataxina tratadas con nicardipino, sildenafil y rolipram. Además se observa que la disminución del Ca^{2+} citosólico se presenta tanto en el soma como en la red neurítica (**Figura 62B**).

Los resultados confirman que los tratamientos con inhibidores de PDE, a través del aumento de los niveles de cAMP y cGMP, favorecen la disminución de los niveles de Ca^{2+} citosólico en las neuronas sensitivas deficientes en frataxina.

4.2.3. Los inhibidores selectivos de PDE revierten la distrofia axonal en el déficit de frataxina

Por último estudiamos la efectividad de los tratamientos sobre el proceso de neurodegeneración axonal. Para ello se realizó el estudio de la morfología mitocondrial. Las neuronas sensitivas deficientes en frataxina YG8R se trataron desde la siembra con nicardipino, sildenafil y rolipram. A los 5 *div* se marcó la mitocondria con la sonda mitotracker deep red y se detectaron las neuronas con β -tubulinIII mediante IFI. La descripción de los parámetros morfológicos de la mitocondria se realizó en la zona proximal de la neurita, desde que sale del soma hasta la primera bifurcación con el macro "mito-morphology". Se analizaron los parámetros de número de mitocondrias/100 μm , el % de área celular ocupada por la mitocondria, el índice de elongación, el índice de interconectividad y la hinchazón mitocondrial.

Las imágenes de microscopía confocal de la **Figura 63** muestran en el ratón YG8R, en condiciones basales, una alteración patológica evidente con focos que acumulan o retienen una gran cantidad de mitocondria. Sin embargo estas alteraciones axonales dejan de ser tan evidentes en el ratón YG8R tratado con nicardipino, sildenafil y rolipram en los que se observa una mitocondria menos retenida y con una distribución más homogénea a lo largo de la red neurítica.

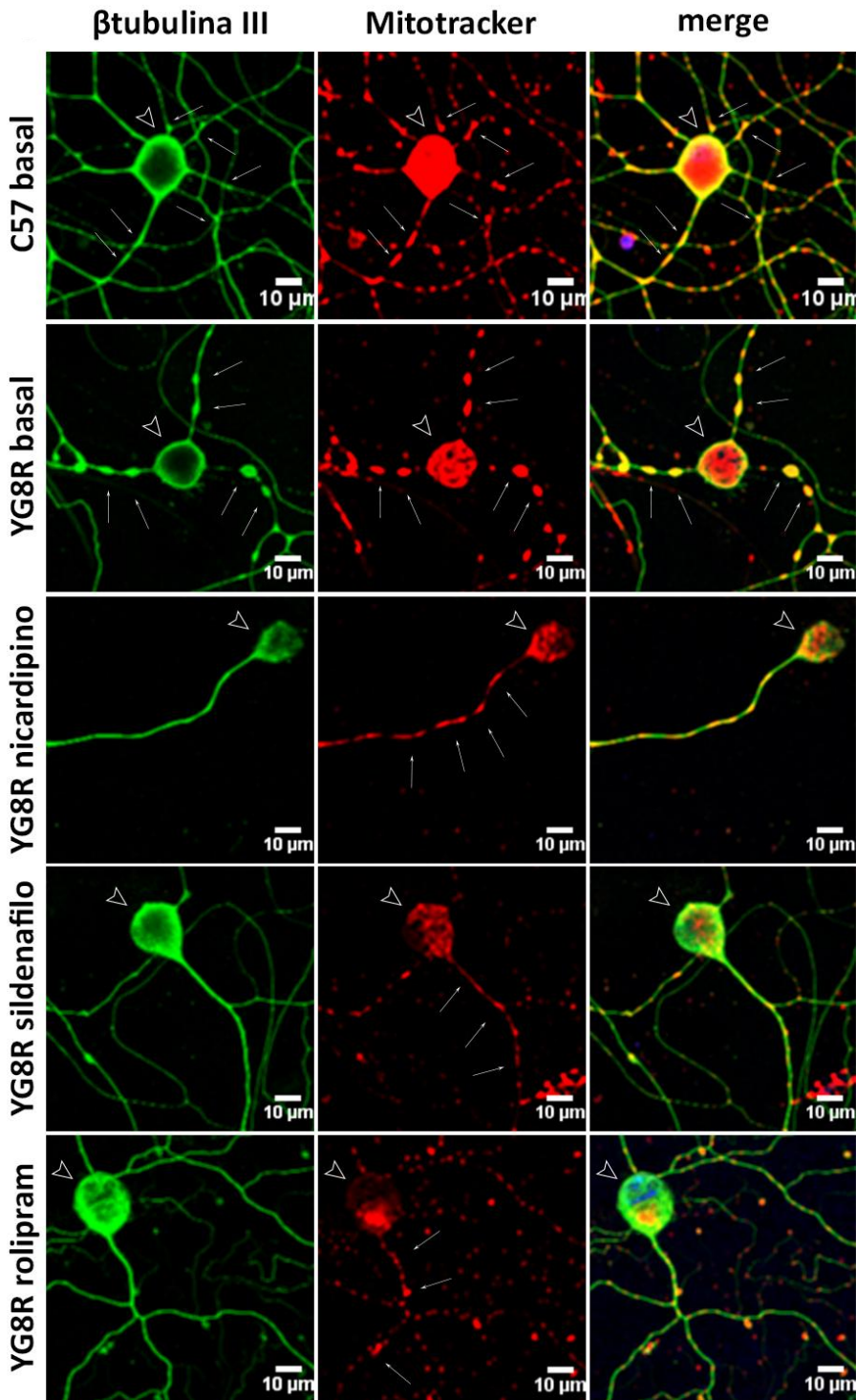


Figura 63. Patrón de la red neurítica y mitocondrial en neuronas sensitivas del modelo murino FRDA tratadas con inhibidores de PDE.

Las imágenes de microscopía confocal muestran la fluorescencia del marcaje mitocondrial con mitotracker deep en rojo y la fluorescencia del marcaje neuronal con β -tubulinaIII en verde. Las imágenes son representativas de la morfología mitocondrial y del citoesqueleto de las neuronas sensitivas del ganglio dorsal. Se observa la formación de esferoides axonales con acumulación mitocondrial en el ratón deficiente YG8R y la reversión en los tratamientos con nicardipino, sildenafilo y rolipram. Las cabezas de flecha [∇] indican los somas neuronales y las flechas [\uparrow] indican la distribución mitocondrial a lo largo de las neuritas.

La cuantificación de los parámetros mitocondriales en condiciones basales a los 5 *div* indican que el déficit de frataxina provoca un aumento del número de mitocondrias que ocupan una mayor superficie de la neurita, una disminución del índice de elongación, un aumento de la interconectividad y un aumento del hinchazón de la mitocondria, de forma significativa con respecto al control C57BL/6J (**Figuras 64A-64F**).

Las neuronas sensitivas deficientes en frataxina YG8R tratadas con nicardipino, sildenafilo y rolipram muestran una reversión de las alteraciones en la morfología mitocondrial que tienden a alcanzar los niveles del control C57BL/6J en condición basal (**Figura 64A-64F**). Observamos que la eficacia de los tratamientos en la reversión de las alteraciones morfológicas es diferente. El tratamiento con sildenafilo y rolipram recuperan la morfología mitocondrial con la misma eficacia hasta dejarlas en rangos muy similares al control C57BL/6J. El sildenafilo y rolipram no reducen el número de mitocondrias, pero sí disminuyen el porcentaje de área axonal que ocupa la mitocondria, aumentan el índice de elongación, disminuyen el índice de interconectividad y disminuyen el hinchazón axonal hasta los niveles del control C57BL/6J. El tratamiento con nicardipino tiene una eficacia menor y algunos parámetros los recupera, como el índice de elongación y el hinchazón axonal, pero otros no, como la interconectividad o el número de mitocondrias (**Figuras 64A-64F**).

El hecho de que el sildenafilo y el rolipram no disminuyan el número de mitocondrias en la zona proximal de la neurita puede ser debido a que al revertir la interconectividad entre ellas las mitocondrias se separan y el número de mitocondrias aumenta. La retención debería disolverse pero si el tratamiento no ha conseguido recuperar totalmente el transporte axonal no se consigue disminuir el número de mitocondrias en la zona proximal hasta los niveles del control C57BL/6J. El tratamiento con nicardipino no mejora el índice de interconectividad, por lo que a pesar de mejorar el índice de elongación y el índice de hinchazón, la mitocondria continúa agregada y retenida en la zona proximal de las neuritas, aumentando todavía más el número de mitocondrias retenidas.

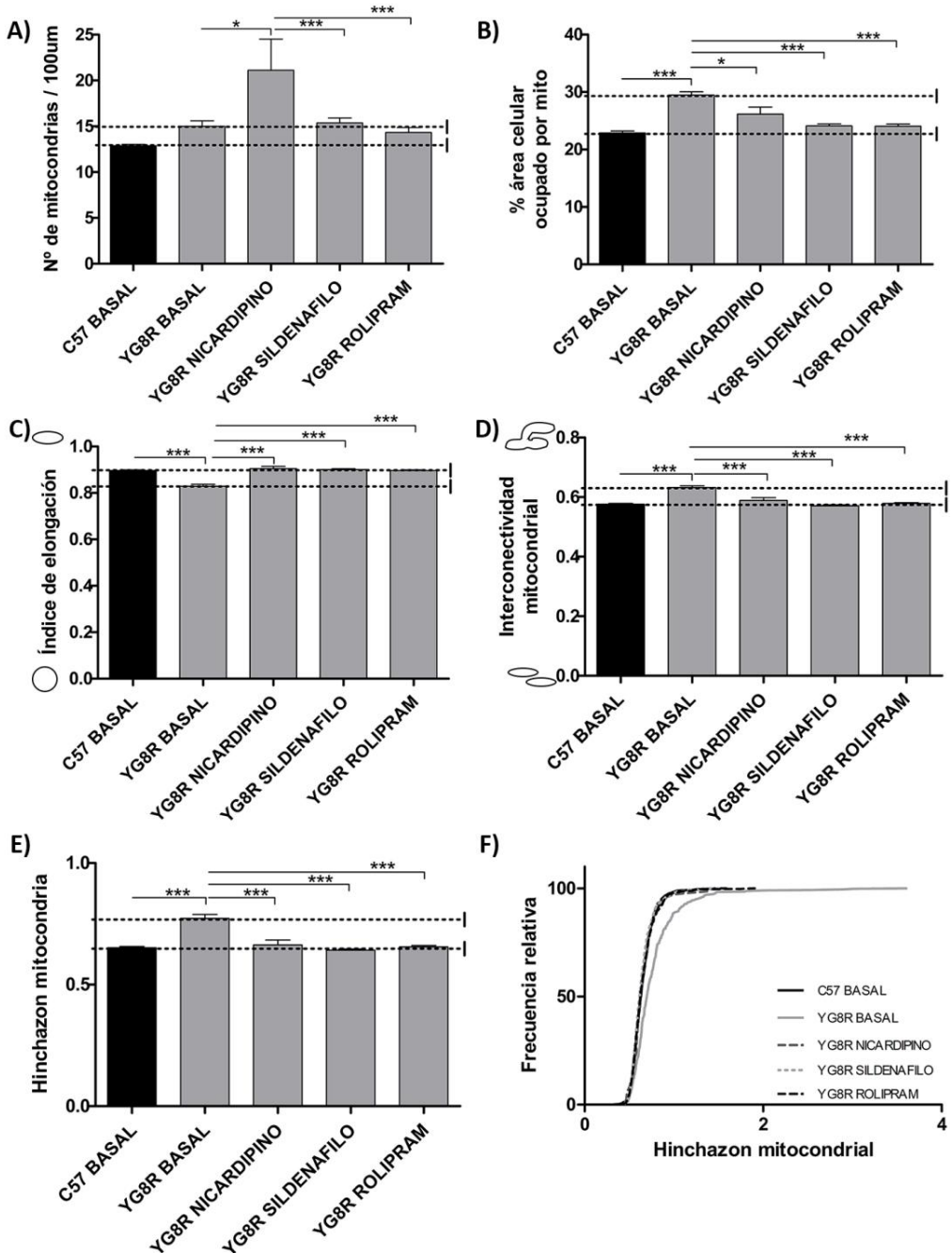


Figura 64. Cuantificación de los descriptores de la morfología mitocondrial en neuronas sensitivas del modelo murino FRDA tratadas con inhibidores de PDE.

A) Número de mitocondrias por 100 μm de neurita. **B)** Porcentaje de la superficie axonal ocupada por la mitocondria. **C)** Índice de elongación, corresponde a la media de la inversa de la circularidad de las mitocondrias analizadas. **D)** Interconectividad mitocondrial, corresponde a la media del ratio área/perímetro de las mitocondrias analizadas. **E)** Hinchazón de la mitocondria, corresponde al índice de

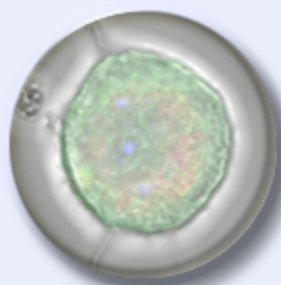
interconectividad normalizado con el índice de elongación o circularidad para medir el hinchamiento de la mitocondria. **F)** Distribución de los tamaños del hinchazón mitocondrial. Los datos representan la media \pm S.E.M de tres repeticiones experimentales con un total de 185, 188, 25, 213 y 193 neuronas medidas para C57 basal, YG8R basal e YG8R tratado con nicardipino, sildenafilo y rolipram, respectivamente. Análisis ANOVA unifactorial por genotipo y nivel de significación * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

La **Figura 64F** representa la distribución de la frecuencia de los índices de hinchazón de las mitocondrias analizadas y observamos que el control C57BL/6J presenta mitocondrias con un índice de hinchazón menor a 2, sin embargo las mitocondrias del ratón YG8R llegan a presentar índices de hinchazón mitocondriales de hasta casi 4, es decir el doble. Observamos que los tratamientos con inhibidores de PDE disminuyen este índice hasta 2.

Los resultados sugieren que los tratamientos con inhibidores de PDE disminuyen significativamente la formación de esferoides axonales en el déficit de frataxina. Además la eficacia terapéutica presenta una correlación directa entre el grado de disminución del Ca^{2+} citosólico y la recuperación de la morfología mitocondrial. De forma que tanto el aumento de cGMP con sildenafilo como el de cAMP con rolipram consiguen disminuir los niveles de Ca^{2+} citosólico y recuperar la distrofia axonal en las neuronas sensitivas deficientes en frataxina. El tratamiento con nicardipino, que no modifica casi los niveles de calcio citosólicos, mejora algunos parámetros mitocondriales pero no consigue revertir completamente las alteraciones axonales.

Los resultados confirman que los tratamientos con inhibidores de PDE, a través del aumento de los niveles de cAMP y cGMP, favorecen la disminución de los niveles de Ca^{2+} citosólico y de la formación de esferoides axonales en las neuronas sensitivas deficientes en frataxina, revertiendo el proceso de neurodegeneración que sufren.

DISCUSIÓN



La FRDA es la ataxia hereditaria más común. Es una enfermedad neurodegenerativa causada por la disminución de la proteína mitocondrial frataxina. Los pacientes sufren una neuropatía periférica de carácter axonal y sensitiva con una progresión *dying-back*. El daño axonal se inicia con la pérdida de los axones mielinizados de las neuronas grandes o propioceptivas del ganglio dorsal y progresa lentamente hasta las columnas posteriores y los tractos corticoespinales y espinocerebelosos de la médula espinal. El modelo de degeneración *dying-back*, descrito en la FRDA, implica una degeneración distal de las neuronas sensitivas periféricas, con deterioro inicial de la sinapsis, que progresa retrógradamente hasta el SNC. Este mecanismo de daño *dying-back* se ha descrito también en muchas enfermedades neurodegenerativas crónicas y se caracteriza porque se desconoce el sitio y el momento en el que aparece el daño que origina la neurodegeneración.

El objetivo de esta tesis doctoral ha sido contribuir a la identificación y caracterización de los mecanismos moleculares que permiten la degeneración selectiva de las neuronas propioceptivas del ganglio dorsal durante el progreso de la FRDA. Para ello se ha realizado un abordaje genómico, proteómico y celular del estudio de las neuronas sensitivas del ganglio dorsal que ha permitido averiguar por qué estas neuronas son más sensibles a la deficiencia de frataxina que el resto de neuronas sensitivas del ganglio dorsal.

El aislamiento de las neuronas propioceptivas de ganglio dorsal en ratón adulto y la obtención de su perfil de expresión génica ha permitido identificar nuevos marcadores específicos, PAC1R y GalR1, pertenecientes a la familia de GPCR. Este descubrimiento ha sido esencial para conocer nuevos mecanismos por los que el déficit de frataxina afecta principalmente a este tipo neuronal.

La investigación funcional y celular de la proteína frataxina en el modelo murino de FRDA deficiente en frataxina, YG8R, y el estudio de las diferentes rutas biológicas implicadas en el déficit de frataxina ha favorecido un mejor conocimiento de la fisiopatología de la enfermedad. Este conocimiento más certero de la degeneración neuronal ha permitido abrir nuevas puertas de investigación para lograr una terapéutica más acertada y práctica.

1. El YG8R como modelo murino de degeneración *dying-back in vivo e in vitro* en la FRDA

El modelo murino de FRDA, YG8R, que hemos utilizado en esta tesis doctoral fue desarrollado por el Dr. Pook y colaboradores (2006), y contiene la expansión del triplete GAA dentro del contexto genómico humano. Hasta la fecha es el modelo murino que más se ha estudiado y que mejor desarrolla algunos procesos patológicos de la enfermedad humana como la inestabilidad somática de la expansión GAA dependiente de la edad, degeneración neuronal, estrés oxidativo, disfunción mitocondrial e impedimento de la coordinación motora leve. El ratón YG8R también presenta reducida actividad locomotora y ganancia de peso. Además el fenotipo empeora con la edad, apareciendo grandes vacuolas degenerativas en el ganglio dorsal y acumulación de hierro mitocondrial en el tejido cardíaco [14]. Otros autores

han ampliado el conocimiento sobre este modelo, como el Dr. Cortopassi y colaboradores (2013, 2014) que determinaron mediante el estudio de la expresión de mRNA del ganglio dorsal, con el microarray MOE430 2.0 de Affymetrix, que el ratón YG8R presenta un defecto en enzimas antioxidantes y un aumento de proteínas inflamatorias que le hacen más susceptible al estrés oxidativo y al proceso de neurodegeneración [105, 107]. Nuestro estudio del modelo murino FRDA, YG8R, es coincidente con los resultados previos de estos autores pero además aporta nuevas e interesantes perspectivas en otros campos de estudio no descritos anteriormente.

El estudio *in vivo* del modelo murino FRDA ha confirmado los defectos en la coordinación motora, en el equilibrio y en el sentido del posicionamiento de forma dependiente al número de copias del transgén YG8 y desde edades tempranas de 4 meses de edad. La afectación en la propiocepción debida al déficit de frataxina no ha sido descrita previamente en los modelos murinos de FRDA. Estas alteraciones locomotoras podrían favorecer el aumento de peso corporal que presentan.

El estudio de la supervivencia del modelo murino de FRDA, YG8R, ha descrito por primera vez que el déficit de frataxina no influye en la supervivencia de los ratones, pero que el aumento del peso corporal que presentan los machos deficientes en frataxina surge como un posible predictor de muerte natural en el modelo murino. La disfunción cardíaca es la primera causa de mortalidad en los pacientes de FRDA, en el 59% de los casos, como describieron Tsou y colaboradores en su estudio de 2011 [170]. El modelo murino FRDA, YG8R, presenta un fenotipo neuronal y locomotor pero no desarrolla miocardiopatía, por lo que no se ha podido determinar la implicación de la miocardiopatía en la supervivencia del modelo murino deficiente en frataxina. Si el peso corporal influye en la supervivencia de los pacientes lo hace de forma secundaria a la disfunción cardíaca, siendo un posible factor de riesgo asociado a tener en cuenta.

La disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo se han descrito en una multitud de modelos deficientes en frataxina como en levadura [30], *Drosophila* [16], *C.elegans* [15], modelos celulares de “déficit crónico de frataxina” [18], modelos neuronales transitorio de “déficit agudo de frataxina” [171, 172] y modelos murinos de “déficit crónico de frataxina” como el YG8R [14]. También en multitud de muestras de pacientes, como en fibroblastos [17], muestras de orina y plasma [12, 13] y en biopsias cardíacas [157].

En nuestro caso la combinación de tres abordajes distintos con el estudio de la bioquímica en los cuatro tejidos neuronales afectados por WB, el estudio de la neurona sensitiva en cultivo primario y el estudio proteómico del ganglio dorsal, han confirmado que a edades avanzadas el modelo murino de FRDA, YG8R, presenta una gran disfunción mitocondrial con implicación del estrés oxidativo como mecanismo de neurodegeneración. Además hemos descrito por primera vez que el modelo murino FRDA, YG8R, *in vivo* presenta mayor afectación en las raíces periféricas, que expresan una menor cantidad de frataxina, y que esta afectación se va diluyendo conforme nos dirigimos al SNC y la cantidad de frataxina va aumentando. Por lo tanto la afectación neuronal es dependiente de la expresión diferencial de frataxina en cada uno de los

tejidos y dependiente del nivel topográfico al que pertenece el tejido, periférico o central. De esta forma la expresión diferencial de frataxina favorece un proceso de neurodegeneración *dying-back*, que implica al estrés oxidativo como mecanismo fisiopatológico. Esto sugiere que la axonopatía distal, que presenta el ratón YG8R, puede ser un defecto primario en la fisiopatología de la FRDA siendo la degeneración del ganglio dorsal y de las columnas posteriores consecuencia de la neuropatía *dying-back* que se origina en las raíces periféricas del ganglio dorsal.

Esta axonopatía periférica que sufre el ratón deficiente *in vivo* la confirmamos en las neuronas sensitivas *in vitro*, que desarrollan un proceso de distrofia axonal en cultivo primario, como un claro marcador de neurodegeneración axonal.

En muchos modelos de déficit de frataxina se ha encontrado un crecimiento celular enlentecido y una disminución de la viabilidad. En algunos modelos transitorios de déficit agudo de frataxina, como en cultivo primario de ganglio dorsal de rata [171] y en neuroblastoma diferenciado [172], el crecimiento enlentecido y la viabilidad están asociados con la activación de la apoptosis, probablemente debido a que son modelos transitorios con un déficit agudo de frataxina. Sin embargo en otros modelos de déficit crónico de frataxina, como en neuroblastoma no diferenciado desarrollado en nuestro laboratorio [18], no se detecta apoptosis y la reducción en el crecimiento celular se ha asociado con un proceso de senescencia que retiene a las células deficientes en la fase G1 del ciclo celular. En biopsias de pacientes de FRDA también se ha confirmado un menor tamaño de las neuronas del ganglio dorsal, con una disminución en el diámetro, asociado con una hipoplasia en el desarrollo y una atrofia añadida [49]. Es en el desarrollo cuando la senescencia podría tener un papel importante, provocando la hipoplasia descrita en las biopsias de pacientes.

El modelo murino de FRDA, YG8R, es un modelo crónico con una deficiencia parcial en frataxina. Los cultivos primarios de neuronas sensitivas *in vitro* deficientes en frataxina crecen de forma similar al control C57BL/6J, sin apreciarse cambios visibles entre ellos, en la morfología o la cantidad de neuronas o en la presencia de muerte neuronal. Sin embargo el análisis morfométrico más detallado confirma un crecimiento enlentecido de las neuronas sensitivas *in vitro*, a los 3 y 5 *div*, debido a que presentan un menor diámetro de los somas neuronales. Los resultados obtenidos a los 3 *div* hacen pensar que hay una pérdida de la población neuronal más grande, asociada a las neuronas propioceptivas. Sin embargo, el hecho de que a los 5 *div* la diferencia en el tamaño se hace menos evidente y que se detectan neuronas propioceptivas con marcadores específicos en los cultivos primarios nos indica que existe un retraso generalizado en el crecimiento de todas las poblaciones neuronales del ganglio dorsal. Además el hecho de que a los 5 *div* algunas de las neuronas sensitivas alcanzan el tamaño del control C57BL/6J e incluso aparece una población con un diámetro y un área excesivamente más grandes que el control, nos indica que conforme pasan los días en cultivo los somas neuronales sufren un hinchamiento como parte de un proceso patológico. Por lo que sugerimos que este retraso en el crecimiento generalizado de todas las neuronas sensitivas puede deberse al fallo energético asociado a la falta de frataxina, ya que no observamos activación de la

apoptosis, ni en los tejidos neuronales ni en el cultivo neuronal. Debido a que son neuronas sensitivas no replicativas descartamos la senescencia como proceso implicado en este retraso del crecimiento.

La apoptosis es un mecanismo que lleva a la muerte celular en respuesta a daños celulares como el estrés oxidativo. En el modelo murino de FRDA, YG8R, el tejido neuronal *in vivo* más afectado por el estrés oxidativo son las raíces periféricas, pero no presentan apoptosis, posiblemente porque tienen una elevada cantidad de la proteína Bcl-2 que ejerce un efecto protector y las protege de la degeneración axonal. El resto de tejidos neuronales *in vivo* además de no presentar apoptosis tampoco presentan estrés oxidativo, incluso parece que tienen una respuesta activada frente al estrés oxidativo como el ganglio dorsal que sobreexpresa catalasa y todos los tejidos neuronales que aumentan la MnSOD. Esta respuesta antioxidante posiblemente evita que el proceso oxidativo sea tan extenso que dispare la muerte neuronal por apoptosis.

En el ganglio dorsal del ratón *in vivo*, donde se localizan los somas de las neuronas sensitivas, no hemos encontrado daño oxidativo, sin embargo en las neuronas sensitivas *in vitro* hemos detectado una gran producción de anión superóxido, indicativo de un proceso de estrés oxidativo, tanto en las neuritas como en los somas neuronales. Éstos resultados contradictorios nos llevan a pensar que posiblemente en el ganglio dorsal *in vivo* las células no neuronales como células de Schwann y células satélites estén favoreciendo la respuesta antioxidante. Una posible respuesta sería la secreción de eritropoyetina (EPO) por las células de Schwann, ya que es una vía de neuroprotección endógena del SNP que protege a las neuronas sensitivas frente a la degeneración axonal [61]. Además la EPO aumenta los niveles de expresión de la frataxina *in vitro* [42]. El mecanismo por el que protege al axón todavía no se conoce, pero sí se ha demostrado que bloquea la apoptosis del soma neuronal.

La autofagia es un proceso celular que se activa por exceso de ROS y acumulación de proteínas y mitocondria dañada para degradarlos y eliminarlos. También se activa en condiciones de privación nutricional para degradar compuestos energéticos y aportar soporte nutricional. Muchos modelos deficientes en frataxina presentan una activación de la autofagia. En el modelo murino *knockout* condicional en tejido nervioso de frataxina y en el modelo murino YG8R se han observado, en los somas de las neuronas sensitivas del ganglio dorsal, por microscopía electrónica vacuolas características de autofagia similar a los autofagosomas y autolisosomas y depósitos de lipofucsina [14, 38]. Schiavi y colaboradores (2013) observaron un aumento de LC3II basal en un modelo deficiente de frataxina en *C.elegans* y en muestras de linfoblastos de pacientes de FRDA. Por lo que la activación de la autofagia en el déficit de frataxina se ha implicado como una característica previa a la neurodegeneración. Otros modelos de déficit crónico de frataxina, como el neuroblastoma no diferenciado desarrollado en nuestro laboratorio, también presentó una activación basal de la autofagia, detectada por el aumento de LC3II por WB e IFI, pero se interpretó como la activación de un mecanismo citoprotector que intenta responder a

la disfunción mitocondrial y a los daños oxidativos en el déficit de frataxina [18]. En el modelo murino de FRDA, YG8R, hemos encontrado un defecto en el flujo autofágico debido a la falta de activación de LC3II en el tejido neuronal y a la acumulación de un marcador de ubiquitinización, como p62, en la neurona sensitiva *in vitro*. Otro signo que apoya el bloqueo en el flujo autofágico es la presencia de enormes depósitos de lipofucsina en la ultraestructura de las neuronas sensitivas. Los acúmulos de lipofucsina son un signo anatomopatológico producido por el estrés oxidativo presente en el proceso de envejecimiento. Sin embargo acumulaciones excesivas revelan defectos en los sistemas de eliminación como el proteasoma, los lisosomas o la autofagia [173]. Los lisosomas con grandes acúmulos de lipofucsina tienen reducida la habilidad de fusionarse con las estructuras autofágicas, por lo que el flujo autofágico se bloquea [174]. En el modelo YG8R el bloqueo del flujo autofágico lo interpretamos como parte del mecanismo neurodegenerativo ya que resulta en la acumulación progresiva de agregados de proteínas y mitocondrias dañadas que favorecen la progresión de la enfermedad. La reducción en la actividad autofágica también se ha relacionado en otras enfermedades neurodegenerativas como Parkinson, Alzheimer, y Huntington en las que se presentan acúmulos de proteínas ubiquitinadas [174].

Por todo ello sugerimos que las neuronas sensitivas deficientes en frataxina sufren un proceso oxidativo crónico, de forma relevante en las raíces periféricas *in vivo* y en el cultivo neuronal *in vitro*, que no dispara la muerte neuronal por apoptosis pero tampoco consigue activar procesos citoprotectores como la autofagia o la senescencia, como se ha visto en otros modelos de FRDA. La falta de estos mecanismos citoprotectores favorece la acumulación del daño mitocondrial y neuronal y el desarrollo de la neurodegeneración axonal.

Nuestros resultados confirman que el modelo murino de FRDA, YG8R, desarrolla una axonopatía periférica *dying-back in vivo* y distrofia axonal *in vitro* asociadas al estrés oxidativo crónico provocado por el déficit de frataxina, sin activación de la apoptosis y con déficit de la respuesta autofágica. Por lo que tanto el modelo murino de FRDA, YG8R, *in vivo* como el cultivo de neuronas sensitivas *in vitro* son buenos modelos de degeneración axonal *dying-back* y muy útiles para la investigación de los efectos celulares y subcelulares de la FRDA.

2. La disfunción mitocondrial es el sitio de daño inicial que origina el mecanismo de neurodegeneración *dying-back*

La fisiopatología de la FRDA es consecuencia del déficit de frataxina en la mitocondria, pero el mecanismo por el que la frataxina induce la neurodegeneración continúa sin esclarecerse. Por lo que para entender los mecanismos patogénicos de la axonopatía *dying-back* necesitamos conocer el efecto de la depleción de la frataxina en las funciones mitocondriales y en la susceptibilidad específica de determinadas células del sistema nervioso. Una gran cantidad de aspectos fisiológicos de la mitocondria han sido asociados con la neurodegeneración, por lo que parece interesante investigarlos en la FRDA. Estos aspectos incluyen bioenergética, tráfico y distribución

mitocondrial, comunicaciones con el RE, homeostasis del Ca^{2+} o el control de la calidad mitocondrial [175].

Hay muy pocos estudios de la degeneración axonal en el déficit de frataxina y la implicación de la disfunción mitocondrial en esta degeneración *dying-back*. Shidara y Hollenbeck (2010) describieron, en un modelo *knockdown* de frataxina en *Drosophila*, una neurodegeneración *dying-back* temprana durante el desarrollo que asociaron con una mitocondria despolarizada con fallo en el transporte axonal retrógrado y una distribución sináptica anormal. De esta manera relacionaron el defecto en el transporte mitocondrial a través del axón y el fallo en la distribución de la mitocondria en estructuras nerviosas específicas con la FRDA en invertebrados [147]. Carletti y colaboradores (2014) en un modelo *knockdown* de frataxina en la línea celular de motoneurona NSC34 encontraron una disminución de la proliferación celular, un aumento del glutatión oxidado, y una ausencia de neuritas, implicando al glutatión oxidado como modulador redox de la polimerización de las proteínas del citoesqueleto que favorece la retracción axonal y la neurodegeneración [33]. Mincheva-Taheva y colaboradores (2013) en un modelo *knockdown* de frataxina en cultivo primario de ganglio dorsal de rata observaron que la depleción de frataxina causaba la despolarización mitocondrial, la degeneración de la neuritas y la muerte neuronal por apoptosis debido a un aumento de los niveles de Ca^{2+} citosólicos y a la activación de vías de señalización mediadas por Ca^{2+} , Ca^{2+} -CREB-BAX, sugiriendo que las alteraciones de la homeostasis del Ca^{2+} pueden participar en la neurodegeneración debida al déficit de frataxina [171]. Con respecto a la homeostasis del calcio, en el año 2000, Ristow y colaboradores sobreexpresaron frataxina en adipocitos y observaron que se inducía la recaptación de Ca^{2+} mitocondrial que activaba el flujo del ciclo de krebs y la respiración mitocondrial aumentando los niveles de ATP celulares [29]. Por otra parte Wong y colaboradores (1999) observaron que la quelación del Ca^{2+} intracelular protegía a los fibroblastos de pacientes de la muerte inducida por estrés oxidativo [176]. El trabajo desarrollado en nuestro laboratorio por Bolinches-Amorós y colaboradores (2014) confirmó en el modelo crónico *knockdown* en frataxina un acusado defecto en la recaptación mitocondrial de Ca^{2+} que impide la correcta homeostasis del Ca^{2+} en toda la célula, favorece el fallo energético celular y junto con el estrés oxidativo provoca estrés de RE.

Nuestros resultados en las neuronas sensitivas *in vitro* del modelo murino de FRDA, YG8R, confirman el defecto en el transporte y la distribución mitocondrial a través del axón, las alteraciones en el citoesqueleto y el aumento de los niveles de Ca^{2+} citosólicos asociados al déficit de frataxina. Pero además aportan una detallada descripción del proceso de distrofia axonal, no vista hasta el momento, que ha permitido identificar a la acumulación multifocal de mitocondria disfuncional como el sitio y el mecanismo molecular por el que se desarrolla la degeneración *dying-back* en el déficit de frataxina.

El estudio proteómico del ganglio dorsal del ratón deficiente en frataxina confirmó la gran afectación que sufre el proceso OXPHOS con disminución de cinco puntos de transferencia de electrones en los C_I , C_{II} y C_{III} de la CTE, dos puntos de entrada

alternativa de electrones y en la producción de ATP en el C_V . La afectación de los C_{I+III} , C_{II} , C_{III} , C_{IV} y C_V en la ataxia de Friedreich se ha descrito en muchos trabajos [30, 157]. Un estudio más detallado de las subunidades afectadas reveló que el déficit de frataxina no afecta por igual a todos los centros Fe-S y grupos hemo de la CTE. Este hecho cuestiona la principal función de la frataxina en la síntesis de los centro Fe-S, y responde a la distinta afectación que presentan las actividades de los complejos de la CTE en cada uno de los modelos deficientes en frataxina. Es el caso del trabajo de Carletti y colaboradores (2014) en las motoneuronas deficientes en las que sólo encuentran afectación en el C_I o el trabajo de Bolinches-Amorós y colaboradores (2014) en el modelo crónico *knockdown* en frataxina en el que sólo encuentran afectación del C_{IV} . Muy sorprendente fue confirmar en el ganglio dorsal del modelo murino de FRDA, YG8R, la disminución de las subunidades con las que frataxina interactúa físicamente, SDHA y ETFa, sugiriendo que frataxina además de interactuar con ellas, como demostraron González-Cabo y colaboradores (2005) en nuestro laboratorio, parece que también participa en su conservación. También fue relevante el defecto de las subunidades de síntesis de ATP en el C_V , que confirman la gran repercusión en el fallo energético asociado al déficit de frataxina. Este bloqueo del flujo de electrones a través de la CTE, disminuye el $\Delta\psi_m$ y aumenta la producción de ROS, siendo la causa de la despolarización mitocondrial y el estrés oxidativo que se detectó en las neuronas sensitivas *in vitro* del ganglio dorsal del ratón YG8R. La disminución del $\Delta\psi_m$ junto con el defecto de la síntesis de ATP lleva a la neurona sensitiva a un acusado fallo energético. Esta afectación tan generalizada que conduce a la disfunción mitocondrial con fallo energético y estrés oxidativo, sumado a la disminución de las defensas antioxidantes que presentan el ganglio dorsal, es el mecanismo patogénico que subyace en la degeneración neuronal.

Nuestros resultados describen por primera vez y con gran detalle que la disfunción mitocondrial que sufren las neuronas sensitivas *in vitro* deficientes en frataxina representa el sitio de inicio del daño neuronal que les lleva a desarrollar una distrofia axonal. Hemos comprobado que el déficit de frataxina causa alteraciones en la red mitocondrial y en la red del citoesqueleto, por estrés oxidativo y aumento del calcio citosólico. Estas alteraciones conducen a la formación multifocal de hinchazones y esferoides axonales, con mitocondria disfuncional y dismórfica acumulada, que representa focos axonales que bloquean el transporte axonal en varios puntos a lo largo del axón. El fallo multifocal del transporte axonal favorece la degeneración distal en la sinapsis neuronal, por falta de aporte nutricional y mitocondrial, iniciando el mecanismo de degeneración *dying-back*.

Hemos detectado que en estos esferoides axonales se acumulan muchas mitocondrias, confirmado con los marcajes de mitotracker, Bcl-2, OPA-1 y *Cit c*, indicando un bloqueo del transporte mitocondrial y una incorrecta distribución de la mitocondria a lo largo de toda la neurita, desde la zona proximal hasta la distal, como también observaron Shidara y Hollenbeck (2010) en el modelo *knockdown* de frataxina en *Drosophila*. Además hemos confirmado que esta mitocondria está despolarizada, produce muchas ROS y provoca el aumento del Ca^{2+} intraaxonal local,

como también observaron Mincheva-Taheva y colaboradores (2013). La sobrecarga de Ca^{2+} citosólico surge de la disminución de la capacidad recaptadora de Ca^{2+} debido a la despolarización mitocondrial y al estrés oxidativo asociados al déficit de frataxina, como observaron Bolinches-Amorós y colaboradores (2014).

Nuestras neuronas sensitivas *in vitro* deficientes en frataxina presentan alteraciones del citoesqueleto. Aparece una acumulación o ausencia de los microtúbulos (β tubulina III, α -tubulina), acumulación y disrupción ocasional de los neurofilamentos (SMI32, RT97, NF160) y acumulación y desorientación de filamentos intermedios (periferina). Sin embargo no aparece una rotura evidente del citoesqueleto y las neuronas sensitivas deficientes en frataxina presentan una actividad calpaína muy baja, a pesar del aumento del Ca^{2+} intraaxonal local. Estos hechos nos sugieren que el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ participa en las alteraciones del citoesqueleto y en la formación de los esferoides, pero de forma independiente a la activación de la calpaína. El Dr. Marek Ma en 2013 publicó una extensa revisión del papel de las calpaínas en la disfunción inducida por daño y degeneración del axón en mamíferos. En este trabajo concluyó que las calpaínas contribuyen de forma importante a la degeneración Walleriana por la proteólisis de los neurofilamentos, pero no siempre están activadas en todos los mecanismos de degeneración. La degeneración neuronal es multifactorial y otros factores pueden participar en la degeneración axonal como el UPS, la autofagia o el propio aumento de Ca^{2+} , que por sí sólo puede producir la despolimerización de los microtúbulos directamente, sin la activación de la calpaína, y participar en la desorganización temprana del citoesqueleto [177]. Otros investigadores también descartan la participación de la calpaína en los procesos de neurodegeneración, como Nguyen y colaboradores (2013) que describieron en fibroblastos envejecidos un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ con disminución de la actividad calpaína. Curiosamente, en este trabajo, el tratamiento de células jóvenes con rotenona, que inhibe la CTE, y con H_2O_2 , que genera estrés oxidativo, provoca el mismo efecto de aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ con disminución de la actividad calpaína. La explicación se debe a que durante el envejecimiento se produce la elevación de las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sin embargo la actividad de las enzimas y proteínas dependientes del Ca^{2+} como calpaína, PKC, calcineurina, calmodulina, quinasas dependientes de Ca^{2+} /calmodulina y calbindina están disminuidas, debido a que hay un déficit de estas enzimas y proteínas [178]. Por lo que con todo ello podemos afirmar que en nuestro modelo murino FRDA, YG8R, las neuronas sensitivas deficientes en frataxina sufren una elevación de las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mantenidas en el tiempo que participa en la despolimerización de los microtúbulos y favorece las etapas tempranas de la distrofia axonal que sufre el ratón, pero con ausencia de la activación de la calpaína debido a su déficit, como reveló el estudio proteómico del ganglio dorsal del ratón deficiente a los 24 meses de edad.

Hemos encontrado que las neuronas deficientes en frataxina son susceptibles de sufrir una axonopatía proximal debido a un bloqueo del transporte anterógrado. Las acumulaciones de los neurofilamentos y microtúbulos, la retención de mitocondria, la

acumulación vesículas de transporte rápido anterógrado (APP y sinaptofisina), la ubiquitinización focal y la acumulación de lisosomas en los esferoides axonales demuestran que la axonopatía resulta en el impedimento del transporte axonal. La acumulación de vesículas de transporte rápido anterógrado (APP y sinaptofisina) sugiere que el transporte anterógrado axonal está bloqueado, lo que favorece la degeneración de la sinapsis en la zona distal por aporte insuficiente de nutrientes y mitocondria, y sugiere que el modelo de lesión multifocal favorece el daño distal y provoca una degeneración *dying-back*.

El bloqueo tan generalizado de vesículas de transporte axonal anterógrado, mitocondria y citoesqueleto, que presentan las neuronas sensitivas deficientes en frataxina, hace sospechar que posiblemente el transporte axonal retrógrado también está impedido. Shidara y Hollenbeck (2010) confirmaron en el modelo *knockdown* de frataxina en *Drosophila* una acumulación de mitocondria despolarizada por impedimento del transporte retrógrado que relacionaron con el proceso de neurodegeneración en la sinapsis neuronal, sin embargo no encontraron un impedimento en el transporte anterógrado como nosotros [147]. Una afectación del transporte retrógrado tiene gran repercusión en dos procesos neuronales muy importantes para su supervivencia: en la eliminación por autofagia de la mitocondria dañada y en la asimilación de factores de crecimiento y sustancias tróficas endocitadas en la zona distal y transportadas al soma neuronal, como las neurotrofinas, para promocionar la supervivencia neuronal y modular la expresión génica [146].

El defecto en la disponibilidad de las neurotrofinas, debido a la afectación del transporte retrógrado, sería otra posible respuesta al menor tamaño que presentan las neuronas sensitivas en el cultivo primario de ganglio dorsal. Patel y colaboradores (2003) observaron una disminución en el tamaño de las neuronas propioceptivas en el ratón doble deficiente NT3/Bax. Este modelo permite observar el efecto de la ausencia de neurotrofinas sin la activación de la apoptosis, ya que también es deficiente en Bax, que es una proteína proapoptótica. Hay que recordar que la ausencia de factores neurotróficos dispara la degeneración axonal asociada a la activación de caspasas, de igual forma que ocurre en la eliminación axonal durante el desarrollo. Es posible que en el modelo murino de FRDA, YG8R, el bloqueo del transporte retrógrado producido por las lesiones multifocales a lo largo de las neuritas provoque un déficit parcial de la señalización por neurotrofinas, y que la sobreexpresión de Bcl-2 que encontramos en las raíces periféricas por WB es suficiente para evitar la activación de caspasas y de la apoptosis como mecanismo de neurodegeneración. En las neuronas sensitivas *in vitro* que presentan esferoides axonales no se aprecian signos de condensación nuclear, ni marcaje de caspasa-3 activada en los tejidos neuronales, sugiriendo que la apoptosis no es el mecanismo implicado en la formación de los esferoides axonales y tampoco está provocando la muerte de la neurona sensitiva. Sin embargo, en el modelo de Mincheva-Taheva y colaboradores (2013) encuentran activación de apoptosis con muerte neuronal y degeneración axonal, que revierten con el tratamiento con Bcl-x_L y el dominio BH4 de

Bcl-x_L, posiblemente debido a que su modelo es un modelo neuronal transitorio de “déficit agudo de frataxina”. El rescate con una estrategia antiapoptótica indica que el déficit transitorio de frataxina provoca un mecanismo de degeneración axonal agudo, con implicación de las caspasas, de forma similar al que ocurre con la pérdida de la señales neurotróficas durante el desarrollo. Este mecanismo de degeneración axonal implica que en el momento en el que la neurona pierde la señal neurotrófica, en este caso sería la frataxina, se activan caspasa-6 en el axón y caspasa-3 en el soma que ejecutan la degeneración axonal y la muerte neuronal. Resulta curioso pensar que este modelo está implicando a la frataxina como una señal neurotrófica de supervivencia neuronal y que la depleción de frataxina dispara la muerte neuronal como la que ocurre durante el desarrollo, dando pie a pensar que éste podría ser el mecanismo por el que el déficit total de frataxina induce la letalidad embrionaria, por un exceso de eliminación neuronal o “*prunig*” durante el desarrollo embrionario.

La posibilidad de que las neuronas sensitivas deficientes en frataxina presenten una limitada señalización por neurotrofinas, debido al bloqueo del transporte axonal retrógrado, indica una posible vía de susceptibilidad al daño en las neuronas propioceptivas. Las neuronas propioceptivas utilizan exclusivamente la NT3 para su crecimiento y supervivencia a través del receptor TrkC, sin embargo, el resto de poblaciones neuronales pueden utilizar varias neurotrofinas a través de sus receptores Trk específico. El hecho de no disponer de señalizaciones alternativas puede ser un punto clave que hace más sensible a la neurona propioceptiva frente al déficit de frataxina, repercutiendo con más relevancia en su crecimiento, supervivencia y plasticidad sináptica.

Otra de las consecuencias en el defecto del transporte retrógrado sería un bloqueo en la eliminación por autofagia de la mitocondria disfuncional. Ya hemos visto que en nuestro modelo murino FRDA, YG8R, hay un bloqueo del flujo autofágico por la acumulación de p62 y lisosomas en los esferoides axonales, los enormes depósitos de lipofucsina que indican que los lisosomas no son funcionales y la falta de formación de LC3II en el tejido neuronal. Por lo tanto el bloqueo del transporte retrógrado puede estar participando en este bloqueo del flujo autofágico que provoca la acumulación de proteínas y las mitocondrias dañadas, empeorando el daño mitocondrial y axonal.

Las disfunciones mitocondriales, con el estrés oxidativo como evento primario, están asociadas con inicios asintomáticos y manifestaciones clínicas heterogéneas que llevan al envejecimiento, cáncer, diabetes, miocardiopatía, anemia y neurodegeneración. Una mitocondria defectuosa libera grandes cantidades de ROS que asociado a la disminución de las defensas antioxidantes, lleva a un fallo energético mitocondrial considerado la causa del envejecimiento y de las enfermedades degenerativas asociadas con la edad. El estrés oxidativo y el fallo de la homeostasis de calcio afectan fuertemente muchos procesos celulares acoplados con la transducción de las señales y la supervivencia celular, y en definitiva promocionan las enfermedades degenerativas [74, 75, 77, 79, 175, 179]. Una mitocondria

disfuncional con dishomeostasis del calcio, depleción de ATP y generación de ROS se ha encontrado en muchos trastornos axonales, sugiriendo que la mitocondria actúa como un sensor central del estímulo degenerativo. De forma que la mitocondria es el punto central que dirige al axón hacia el control homeostático o hacia la destrucción axonal, si no consigue superar el estímulo degenerativo. Un bloqueo del transporte axonal, que impide la correcta biogénesis y eliminación mitocondrial, es suficiente para causar axonopatía [71, 180].

El enorme gasto energético y los grandes volúmenes de los axones que se alejan distancias tan largas del soma hacen que el mantenimiento de la sinapsis sea un gran reto para las neuronas. Este reto incluye la distribución uniforme del citoesqueleto, del aporte energético en las regiones distantes del axón, de la homeostasis del calcio, de la eliminación de orgánulos axonales aberrantes y de agregados de proteínas, de la eficacia de mecanismos de protección endógena frente a daños mecánicos y al daño por estrés oxidativo y finalmente de la necesidad de transportar múltiples señales largas distancias desde y hasta el soma neuronal. Con todos estos retos, no es de extrañar que la homeostasis axonal esté comprometida en muchas enfermedades neuronales. La importancia del transporte axonal bidireccional largas distancias de proteínas axonales, mitocondria, vesículas y otras cargas se ha implicado en muchos mecanismos de enfermedades neuronales, pero continúa sin conocerse los mecanismos moleculares que disminuyen el transporte y limitan la salud axonal [181]. Mucho de lo que conocemos acerca de la regulación celular y molecular de la degeneración axonal en condiciones patológicas se ha originado en estudios con el axón compartimentalizado y separado del soma (degeneración axonal por déficit de neurotrofinas) y en estudios de modelos de eliminación axonal del desarrollo. Para simular la patología del axón durante el daño neuronal el modelo más utilizado es la transección del nervio o axonotomía, que resulta en una rápida desintegración de los componentes axonales mediante el mecanismo de la degeneración walleriana. Sin embargo conseguir un buen modelo de estudio que reproduzca los patrones de la degeneración en las patologías crónicas es muy difícil debido a los múltiples factores que lo originan de forma crónica. Nuestro modelo murino de FRDA, YG8R, ha conseguido reproducir un modelo de degeneración *dying-back* asociado al déficit crónico de fraxina tanto *in vivo* como *in vitro*. Y hemos demostrado que la patología mitocondrial y la formación de múltiples focos de daño axonal son el punto de inicio del mecanismo de degeneración *dying-back*. En este modelo el estrés oxidativo y la dishomeostasis del Ca^{2+} actúan como factores iniciadores de lesión focal axonal. Siendo la patología mitocondrial focal intraaxonal un signo ultraestructural de daño temprano que precede a los cambios morfológicos del axón por rotura proteolítica. En nuestras neuronas sensitivas la formación de lesiones focales a lo largo de las neuritas implican un defecto en el transporte axonal de mitocondria y nutrientes y una insuficiente señalización por Ca^{2+} en la terminación sináptica, trasladando el daño focal axonal a la sinapsis neuronal. Éste es un nuevo enfoque para la degeneración *dying-back* que sufren los pacientes de FRDA y explica que la degeneración axonal aparezca antes en las terminaciones distales mientras que la porción proximal

permanece más intacta, sin necesidad de inferir que exista una propagación retrógrada de la degeneración por un daño distal primario. En nuestras neuronas sensitivas deficientes en frataxina hemos observado muchas alteraciones en el citoesqueleto pero no aparece una rotura evidente de las neuritas, es decir que sufren las fases de formación de esferoides y desensamblaje del citoesqueleto sin llegar a la fase final de rotura del citoesqueleto y desintegración de las neuritas. Sugiriendo que el cultivo primario de ganglio dorsal aporta un modelo *in vivo* de la degeneración axonal muy útil para la investigación de los mecanismo moleculares bioquímicos que subyacen en la neurodegeneración de la FRDA y para la valoración de la eficacia de tratamientos que consigan revertir la formación de estos esferoides axonales.

3. Defectos en la señalización por calcio en la neurodegeneración *dying-back* en la FRDA

El estudio de los mecanismos que regulan el Ca^{2+} intracelular en las neuronas sensitivas del modelo murino FRDA nos ha permitido confirmar que el déficit de frataxina conlleva una disfunción en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en el soma y en la red neurítica, con un aumento del nivel basal de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mantenido en el tiempo y un acusado defecto en el mecanismo del SOCE. Ambos efectos se deben a la disminución en la capacidad tamponadora del Ca^{2+} de la mitocondria deficiente en frataxina, como demostraron Bolinches-Amorós y colaboradores (2014) en el modelo crónico deficiente en frataxina, previamente en nuestro laboratorio. La capacidad tamponadora de la mitocondria está impedida por la despolarización mitocondrial y el exceso de estrés oxidativo que sufre en el déficit de frataxina.

Ya hemos visto que el aumento del nivel basal de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ participa en las alteraciones tempranas del citoesqueleto, que favorecen la formación de la distrofia axonal y en el mecanismo de degeneración *dying-back*, de forma independiente a la activación de la calpaína y sin rotura final del citoesqueleto.

La disminución del SOCE es un evento patológico que también participa en el mecanismo de degeneración *dying-back* en el déficit de frataxina. Una disminución en el SOCE causa un defecto en el rellenado de los almacenes de Ca^{2+} del RE, después de cada una de las ondas de Ca^{2+} , pero además la disminución de la entrada de Ca^{2+} durante el SOCE impide que difunda por el citoplasma y señalice multitud de funciones neuronales por Ca^{2+} como la transmisión sináptica, la plasticidad neuronal, el crecimiento axonal y la regulación génica.

Por otra parte hay que tener en cuenta el defecto en la señalización por GPCR que encontramos en el ratón deficiente en frataxina. El estudio proteómico del ganglio dorsal confirmó que el déficit primario de frataxina está implicado en la desensibilización del sistema de señalización acoplado a proteína G, debido a defectos en cuatro proteínas G y en cuatro de los efectores de la vía como son $\text{PLC}\beta$, PKC, PKA y CREB que llevan a una situación fisiopatológica con un impedimento grave de la señalización celular en respuesta los GPCR. En las células excitables las ondas de Ca^{2+}

se generan por la activación de los GPCR que abren canales de Ca^{2+} de la MP y además estimulan la salida de Ca^{2+} del RE a través del receptor IP3. El vaciado del RE activa los canales SOC para que entre más Ca^{2+} para rellenar los almacenes del RE y poder generar la siguiente onda de Ca^{2+} . Sin embargo observamos que en las neuronas sensitivas deficientes en frataxina tanto la señal iniciadora por GPCR como el SOCE están disminuidos, provocando un gran impedimento en la generación de los microdominios de Ca^{2+} .

Por otra parte también hay que tener en cuenta los defectos en algunas de las enzimas y proteínas que responden al Ca^{2+} como la calpaína, PKC, calcineurina y calmodulina. La vía Ca^{2+} /calmodulina/calcineurina/NFAT es una de las vías que responde al SOCE más estudiadas. El Ca^{2+} que entra durante el SOCE se une a la calmodulina y se forma el complejo con la calcineurina. Este complejo defosforila el NFAT citoplasmático que migra al núcleo y activa la transcripción génica implicada en procesos esenciales para el desarrollo y la función del sistema nervioso y señala vías implicadas en la guía del crecimiento axonal, el desarrollo neuronal y la integración de la plasticidad sináptica. Además la respuesta de los conos de crecimiento axonal a la estimulación de las neurotrofinas también está mediada por la cascada calcineurina/NFAT [91].

La vía de señalización Trk-neurotrofina también podría estar afectada por la falta de señalización por Ca^{2+} , además de estar impedida por el bloqueo del transporte axonal, como hemos discutido anteriormente. La activación de los receptores Trk, a través de la activación de PLC γ 1, resulta en la movilización de Ca^{2+} celular y la activación de PKC para promover la plasticidad sináptica y la regulación de la transcripción génica para la supervivencia neuronal. Sin embargo si la disminución del SOCE impide el relleno de los almacenes del RE y además las neuronas sensitivas presentan menores niveles de PKC tendremos un defecto en la señalización por Trk.

La suma de todos estos defectos lleva a las neuronas sensitivas deficientes en frataxina a una gran deficiencia en la señalización por Ca^{2+} con una ineficaz capacidad de generar las oscilaciones o microdominios de Ca^{2+} y un defecto en la señalización de multitud de vías implicadas en la transmisión y plasticidad sináptica, el crecimiento axonal y la supervivencia de las neuronas. Por lo tanto en el déficit de frataxina, a pesar de tener niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ más elevados, realmente la funcionalidad de la señalización por Ca^{2+} está disminuida debido a los defectos en el SOCE y a los defectos proteicos en proteínas G y efectores de las cascadas de señalización.

En nuestro modelo murino FRDA encontramos que un defecto en la señalización por Ca^{2+} que es contraria a la activación de vías de señalización mediadas por Ca^{2+} , Ca^{2+} -CREB-BAX, que Mincheva-Taheva y colaboradores (2013) encontraban en el modelo *knockdown* de frataxina en cultivo primario de ganglio dorsal de rata. Posiblemente esta diferencia en las respuestas sea debido a que su modelo de déficit es transitorio y las proteínas de las cascadas de señalización no se han visto afectadas. Sin embargo nuestro déficit se estudia *in vivo* y de forma crónica favoreciendo la afectación de muchos sistemas que *in vitro* no pueden verse tan afectados.

De hecho, Nguyen y colaboradores (2013) plantean la misma hipótesis que nosotros en la enfermedad de Alzheimer. Estos autores observan que con la edad las $[Ca^{2+}]_i$ intracelulares aumentan, pero sin embargo la señalización por Ca^{2+} y las actividades de las proteínas dependientes de Ca^{2+} , como la calpaína, disminuyen paralelamente al fallo energético y al estrés oxidativo asociados con la edad. Este trabajo es muy interesante ya que ponen en entredicho la hipótesis de la sobrecarga de Ca^{2+} en las enfermedades neurodegenerativas. Debido a que las $[Ca^{2+}]_i$ aumentan en células envejecidas se piensa que la sobrecarga de Ca^{2+} en las neuronas es la vía final común que causa el deterioro cognitivo a través de mecanismos de hiperactivación de enzimas dependientes del Ca^{2+} como la calpaína que llevan a la muerte en el Alzheimer. Sin embargo estos autores apuntan a que es el fallo energético y el defecto en la señalización por Ca^{2+} lo que llevan a la muerte del paciente más que el aumento de las $[Ca^{2+}]_i$. Llegan a esta conclusión porque observan que el tratamiento con intermediarios energéticos como fosfoenol piruvato y fosfocreatina disminuye la sobrecarga de Ca^{2+} y reactiva a la calpaína. Y proponen la promoción de la bioenergética y de la señalización del Ca^{2+} como nuevas aproximaciones terapéuticas en la protección neuronal en el Alzheimer [178].

Los procesos de excitabilidad, liberación de neurotransmisores y respuesta del receptor a los neurotransmisores en la sinapsis neuronal son dependientes del Ca^{2+} , así como del aporte de mitocondria y nutrientes a la zona distal de la neurona. Por lo que el bloqueo del transporte axonal y la incorrecta distribución de la mitocondria y nutrientes a las zonas distales de las neuronas sensitivas *in vitro* deficientes en frataxina junto con el defecto del SOCE y de la señalización por Ca^{2+} hace que las sinapsis neuronal sea la zona con mayor sensibilidad a todos estos defectos. El daño multifocal axonal se traslada inicialmente a la sinapsis neuronal por ser la zona más débil debido a su distancia y a su dependencia de la señalización Ca^{2+} . Posteriormente la lesión distal se propaga retrógradamente la degeneración *dying-back*.

La suma de todos estos defectos en el defecto del SOCE, en la señalización por Ca^{2+} asociadas a GPCR para producir las ondas de Ca^{2+} , en las proteínas que responden al Ca^{2+} y en los intermediarios de la señalización Trk-neurotrofina hacen que la neurona sensitiva deficiente en frataxina presente una gran defecto de la señalización por Ca^{2+} que junto con el fallo energético pueden ser las razones de la neurodegeneración que sufren.

4. Defectos en la señalización por GPCR, PACAP/PAC1R, en la neurodegeneración *dying-back* en la FRDA

El defecto en las proteínas G y en multitud de segundos mensajeros y efectores que transducen la señalización por GPCR centró nuestra atención rápidamente debido a que los nuevos marcadores representativos de neuronas propioceptivas descritos en esta tesis doctoral, PAC1R y GalR1, son receptores acoplados a proteínas G. PACAP/PAC1Ra través de la PLC/IP3 y AC/cAMP participa en la movilización del Ca^{2+} del RE y de los canales ROC de la MP para producir las oscilaciones de Ca^{2+} intracelulares y modula la entrada de Ca^{2+} a través de los VOC de la MP participando

en la transmisión del potencial de membrana. Esta señalización por Ca^{2+} mediada por PAC1R juega un importante papel en la regulación de la liberación de neurotransmisores y en la regulación de los receptores de neurotransmisores en la sinapsis neuronal. Pero además PACAP/PAC1R a través de la activación cAMP/PKA ejerce acciones neurotróficas y neuroprotectoras por activación de la transcripción génica. Por todo ello la vía PACAP/PAC1R es muy importante en la diferenciación neuronal, la neurogénesis, la activación de la transcripción génica, la diferenciación neuronal y en la plasticidad y el desarrollo de la sinapsis. PACAP actúa como un factor neurotrófico y neuroprotector, inhibe la apoptosis y promueve la diferenciación, la supervivencia y la regeneración neuronal bajo varias condiciones patológicas como en modelos neuronales de Parkinson y Alzheimer. Por todo ello se ha propuesto a PACAP como agente terapéutico en muchos trastornos neurológicos caracterizados por neurodegeneración como isquemia cerebral, daño cerebral traumático, Parkinson y Alzheimer.

El hecho de que la vía de supervivencia neuronal en respuesta al daño PACAP/PAC1R sea específica de neurona propioceptiva y el hecho de que toda su cascada de señalización está afectada nos sugiere que las neuronas propioceptivas carecen de esta vía de supervivencia frente al daño. La repercusión de la falta de la vía PACAP/PAC1R va más allá de la propia vía y afecta a la transactivación que el PACAP/PAC1R puede hacer del receptor TrkC en ausencia de NT3. Por lo que la neurona propioceptiva se queda sin dos grandes vías de supervivencia, la PACAP/PAC1R y la TrkC-NT3. Además las neuronas propioceptivas no disponen de señalizaciones neurotróficas alternativas. Por todo ello sugerimos que una posible vía de especificidad en la FRDA, serían las vías de señalización acopladas a proteína G, pudiendo ser este el motivo por el que las neuronas más susceptibles del daño por falta de frataxina fuesen las neuronas propioceptivas.

5. Nuevas aproximaciones terapéuticas en la FRDA

La FRDA es un trastorno hereditario crónico que no tiene una terapia efectiva, por lo que la identificación de nuevas dianas terapéuticas que puedan ayudar a la terapia actual supone un importante avance.

La pérdida temprana axonal es un hecho común en muchos trastornos neurodegenerativos que deja a las neuronas funcionalmente inactivas o menos activas debido a la pérdida irreversible de las ramas axonales que han degenerado. Esta pérdida de sinapsis y axones ocurre incluso antes de la aparición de los síntomas y mucho antes de la muerte neuronal [62, 70]. En el SNC no hay regeneración axonal de longitudes grandes, sin embargo en el SNP la neurona puede regenerar sus axones, si las condiciones lo permiten. La regeneración axonal ocurre con frecuencia en las neuropatías periféricas [64], pero incluso los axones de nervios periféricos son incapaces de reinervar sus dianas mientras que la causa del problema persiste [71].

Modelos animales de enfermedades neurodegenerativas tales como Huntington, Alzheimer y ELA han permitido determinar que los defectos en el transporte axonal y

la degeneración axonal preceden a la muerte neuronal [62, 70]. Por lo que retrasando o previniendo la degeneración axonal se aliviarían los síntomas clínicos de estas enfermedades y se podría evitar tanto la muerte axonal como la muerte neuronal en las etapas más tardías [62, 64, 71]. La muerte neuronal ocurre demasiado tarde para ser clínicamente tratable, por ello no es de extrañar que todas las novedosas terapias neuroprotectoras centradas en la supervivencia neuronal han fracasado en aquellas enfermedades neurodegenerativas en las que la degeneración axonal distal es el trastorno patológico primario temprano causante de la sintomatología y la muerte neuronal [61, 67]. Por lo tanto, la degeneración axonal emerge como nueva diana terapéutica en las enfermedades neurodegenerativas porque ocurre antes que la muerte del soma neuronal con un programa activo distinto a la apoptosis e independiente de necrosis [65].

Debido al daño multifocal axonal, la disfunción mitocondrial, al aumento del Ca^{2+} citosólico y al defecto de señalización por GPCR y por Ca^{2+} que encontramos en las neuronas sensitivas deficientes en frataxina en el modelo murino FRDA nos centramos en buscar nuevas aproximaciones terapéuticas que contrarrestasen estos hechos patológicos para conseguir revertir la distrofia axonal que presentan.

Hay muchos trabajos que demuestran que las estrategias farmacológicas que promocionan la salud mitocondrial, también repercuten en una mejora de la salud axonal. Es el caso de los tratamientos con NAD^+ [65], Nmnat2 [69], Bcl-w y laminaB2 que se transportan al axón y ejercen allí su acción protectora [63]. El Bcl-w protege frente a la activación de las caspasas en la degeneración axonal debida a déficits de factores neurotróficos. La laminaB2, NAD^+ y Nmant2 promueven la función mitocondrial, protegen del estrés oxidativo y mejoran la supervivencia y el crecimiento axonal.

Otros trabajos muestran que la corrección del aumento del Ca^{2+} intraaxonal, con quelantes Ca^{2+} , bloqueantes de canales de Ca^{2+} e inhibidores de la calpaína son efectivos en modelos de estudio de degeneración axonal y podrían ser efectivos en las enfermedades neurodegenerativas [67, 68]. De hecho Wong y colaboradores (1999) observaron que la quelación del Ca^{2+} intracelular protegía a los fibroblastos de pacientes de FRDA de la muerte inducida por estrés oxidativo [176] y Mincheva-Tasheva y colaboradores (2013) también observaron que la quelación del Ca^{2+} intracelular protegía a las neuronas sensitivas de la neurodegeneración inducida por el déficit transitorio de la frataxina [171].

Por último, debido a su importancia en la salud y la enfermedad, junto con su potencial para la intervención terapéutica usando pequeñas moléculas reguladoras, los GPCR representan una gran familia de dianas terapéuticas. El aumento de cAMP y cGMP con los inhibidores de PDE ha emergido como un nuevo campo terapéutico muy potente en las enfermedades neurodegenerativas. Maurice y colaboradores (2014) en su revisión sobre los inhibidores de PDE destacan el impacto funcional y terapéutico de la promoción de cAMP y cGMP en una amplia variedad de enfermedades [165]. Nos fijamos en la inhibición de la PDE4 por ser muy selectiva de

cAMP y porque sus inhibidores, como el rolipram, se están probando en fase clínicas en la enfermedad de Huntington y modelos neuronales han confirmado sus efectos promotores de la neuritogénesis. También nos fijamos en la inhibición de la PDE5 por ser muy selectiva de cGMP y porque sus inhibidores, como el sildenafil, están siendo muy efectivos en modelos de enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis. Por último, el nicardipino nos pareció interesante por ser un inhibidor de PDE1 que aumenta tanto cAMP como cGMP pero además es un bloqueante de los canales de calcio tipo L que también se han probado para revertir la distrofia axonal debida a sobrecarga de Ca^{2+} .

Curiosamente el resveratrol es un inhibidor no selectivo de PDE con grandes beneficios metabólicos, especialmente frente a la obesidad y diabetes mellitus II, y se ha propuesto como tratamiento en cáncer, enfermedades cardíacas, condiciones neurodegenerativas y trastornos metabólicos. Li y colaboradores (2013) descubrieron que de 2.000 compuestos de una librería de compuestos bioactivos y productos naturales, el resveratrol era uno de los que aumentaba los niveles del mRNA de frataxina. La administración subcutánea de resveratrol durante 3 días en el modelo murino de FRDA, YG8R, también aumentaba los niveles de la proteína frataxina en cerebro [182]. Los resultados del primer ensayo clínico del resveratrol en pacientes de FRDA se acaban de publicar e indican que el tratamiento durante doce semanas con altas dosis de resveratrol no modifica los niveles de mRNA de frataxina, pero disminuye los marcadores de estrés oxidativo en sangre, mejora las puntuaciones neurológicas en las escalas FARS e ICARS y mejora la eficiencia en el habla [183].

Con todo ello elegimos dos aproximaciones terapéuticas para revertir el daño mitocondrial y la formación de esferoides axonales.

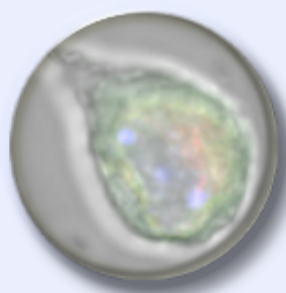
La primera estrategia farmacológica se centró en combatir el aumento del Ca^{2+} citosólico con quelantes del Ca^{2+} e inhibidores de la calpaína por ser tratamientos clásicos y confirmados en otros modelos de FRDA frente a la degeneración axonal. La segunda estrategia farmacológica consistió en aumentar los niveles de cAMP y cGMP, con inhibidores de PDE, por ser claramente una terapia muy novedosa en la recuperación de la axonopatía periférica. Pensamos que el aumento de cAMP y cGMP favorece la función mitocondrial, disminuye los niveles de Ca^{2+} y reactiva la señalización por Ca^{2+} recuperando las funciones neuronales afectadas por el defecto en la señalización por Ca^{2+} y por GPCR, que tan defectuosa está en las neuronas sensitivas deficientes en frataxina. Este planteamiento es novedoso y combina la idea de que la promoción de la función mitocondrial recupera la salud axonal y la idea de que la promoción de la bioenergética mitocondrial recupera la señalización por Ca^{2+} , de forma similar al planteamiento de Nguyen y colaboradores (2013) en el Alzheimer. El estudio de la morfología mitocondrial por microscopía electrónica y confocal nos mostró que en las neuronas sensitivas deficientes en frataxina la red mitocondrial aparece esférica, hinchada e interconectada y se queda retenida en la zona proximal de las neuritas, causando un defecto en su transporte y distribución axonal. Los tratamientos nos mostraron que la disminución de los niveles de Ca^{2+} intracelulares con BAPTA y la inhibición de metaloproteasas, como la calpaína, con o-fenantrolina

mejoran la morfología de la red mitocondrial y revierten la formación de los esferoideos. Debido a que la actividad calpaína está disminuida en las neuronas deficientes en frataxina pensamos que el efecto beneficioso de ambos tratamientos es independiente de su actividad. El aumento del Ca^{2+} citosólico tiene un efecto directo sobre la disfunción citoesqueleto y la disfunción mitocondrial, por lo que una disminución de sus niveles también tiene un efecto directo sobre la reversión de la disfunción. La o-fenantrolina, al ser un inhibidor de metaloproteasas dependientes de cationes divalentes puede ser que esté actuando sobre otras enzimas que intervengan en el proceso de distrofia axonal, activadas por el aumento del Ca^{2+} citosólico. Además es un quelante del Fe^{2+} , por lo que pensamos que muy probablemente también esté actuando sobre la acumulación de Fe^{2+} en la mitocondria mejorando considerablemente la morfología de la red mitocondria y revirtiendo la formación de esferoideos axonales. En fibroblastos de pacientes de FRDA tanto la quelación del Ca^{2+} con BAPTA como la quelación del hierro con deferoxamina fueron efectivos en revertir la muerte celular inducida por estrés oxidativo [176]. Los resultados clínicos de los agentes quelantes, deferoxamina y deferiprona, en pacientes de FRDA han sido contradictorios, disminuyen el daño de las proteínas mitocondriales por ROS y los acúmulos de hierro en el cerebro con una mejora de la función neurológica [42]. Sin embargo reduce la actividad y el mRNA de la aconitasa, e incluso el mRNA de la frataxina, por lo que son poco recomendables para el tratamiento de la FRDA [40]. Quizás una posible alternativa para la eliminación de los depósitos de hierro, restaurar la morfología mitocondrial y revertir la distrofia axonal en los pacientes sea el desarrollo de un fármaco seguro basado en la o-fenantrolina.

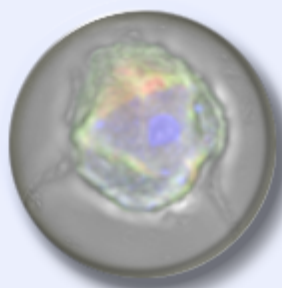
Los resultados confirman que los tratamientos con inhibidores de PDE, a través del aumento de los niveles de cAMP con rolipram y cGMP con sildenafil, favorecen la disminución de los niveles de Ca^{2+} citosólico en las neuronas sensitivas deficientes en frataxina. Ambos tratamientos disminuyen la sobrecarga de Ca^{2+} , recuperan la morfología de la red mitocondrial y revierten la formación de esferoideos axonales en las neuronas sensitivas deficientes en frataxina. El nicardipino, al contrario de lo que esperábamos, no disminuye la sobrecarga de Ca^{2+} citosólico, indicando que los canales de Ca^{2+} tipo L no participan en esta sobrecarga, pero sí recupera la morfología de la red mitocondrial y revierten la formación de esferoideos axonales. Pensamos que el efecto beneficioso de los tres tratamientos con inhibidores de PDE se basa en la promoción de la bioenergética mitocondrial y la recuperación de la señalización del Ca^{2+} , pero estos efectos no los hemos podido valorar.

Acin-Perez y colaboradores (2009-2011) demostraron que el cAMP citosólico no puede atravesar la MMI por lo que existe una cascada AC soluble/cAMP/PKA/PDE2A específica dentro de la mitocondria que responde a determinados estímulos aumentando la concentración de cAMP mitocondrial, que activa la CTE y la producción de ATP. Los inhibidores de la PDE2, como EHNA y BAY60, aumentan los niveles de cAMP mitocondrial, el consumo de O_2 y la producción de ATP, sin embargo el rolipram no conseguía promocionar de forma significativa la producción de ATP [184, 185]. Por otra parte, Park y colaboradores (2012) demostraron que el rolipram

reproduce los mismos efectos beneficiosos del resveratrol, y junto con Tenne y colaboradores (2012) han detallado el mecanismo molecular. El aumento del cAMP citosólico dispara una cascada de eventos que convergen en unos reguladores metabólicos sensibles a la energía y muy importantes como AMPK, SIRT1 y PGC1 α . A través de la activación de la vía Epac1 se activa AMPK que aumenta NAD⁺, que ya hemos visto que presenta un efecto beneficioso sobre la salud mitocondrial y axonal, o a través de PKA activar sirtuina 1 y PGC1 α que tienen un efecto sobre la salud mitocondrial disminuyendo las ROS, y aumentando la biogénesis y la respiración mitocondrial. De forma que el aumento del cAMP actúa también directamente sobre la salud mitocondrial pero también puede ejercer otros efectos beneficiosos en el resto de la neurona que permitan la recuperación de la señalización de la neurona entera. Además rolipram es efectivo en la regeneración axonal y la recuperación funcional tras un daño de la médula espinal [166, 167] y el tratamiento con rolipram mejora las funciones cognitivas y sinápticas del modelo de ratón de Alzheimer [186]. El aumento de cAMP también puede estar promocionando la vía PACAP/PAC1R, por lo que el tratamiento con inhibidores de PDE puede recuperar una vía de supervivencia y regeneración específica de las neuronas propioceptivas. Como plantean Di Benedetto y colaboradores (2013) la existencia de una señalización por cAMP alrededor y dentro de la mitocondria está empezando a desentrañarse, por lo que se abre un campo de estudio muy interesante sobre el mecanismo molecular por el que los inhibidores de PDE consiguen la recuperación mitocondrial y posiblemente también la recuperación del fallo en la señalización por Ca²⁺ promocionando la supervivencia neuronal. Nuestros resultados confirman que el aumento del cAMP y cGMP mejoran la morfología de la red mitocondrial y revierten la patología axonal en las neuronas sensitivas deficientes en frataxina que estaban sufriendo un claro proceso de degeneración axonal. Por lo tanto, proponemos un nuevo campo terapéutico para la FRDA basado en los inhibidores de PDE.



CONCLUSIONES



1. El modelo murino de FRDA, YG8R, presenta un defecto en la coordinación motora, en el equilibrio y en el sentido del posicionamiento, de forma dependiente al número de copias del transgén YG8.
2. El déficit de frataxina no influye en la supervivencia de los ratones, pero sí causa un aumento en el peso corporal, que surge como un posible predictor de muerte natural en el modelo murino.
3. La expresión diferencial de frataxina en los tejidos neuronales, en el modelo YG8R, sugiere la presencia de un proceso de neurodegeneración *dying-back in vivo* originado en las raíces periféricas del ganglio dorsal y que implica al estrés oxidativo como mecanismo fisiopatológico. La degeneración del ganglio dorsal y de las columnas posteriores es consecuencia de la neuropatía *dying-back*.
4. El proceso de neurodegeneración que sufren las neuronas sensitivas del ratón YG8R, implica tanto a los somas neuronales, que presentan una hipoplasia con progresión a la hinchazón, como a las neuritas, que sufren un proceso de distrofia axonal con la formación de esferoides axonales. Las mitocondrias deficientes en frataxina son más redondas, están más hinchadas y aumentan su interconectividad, posiblemente para contrarrestar la disfunción mitocondrial debida al déficit de frataxina, quedándose más agregadas en la zona proximal de las neuritas. La red mitocondrial presenta una distribución anormal a lo largo de las neuritas con retención en los esferoides axonales.
5. El déficit de frataxina causa la disfunción mitocondrial en las neuronas sensitivas con despolarización mitocondrial, aumento de producción de ROS, fallo energético y disminución de la recaptación mitocondrial de Ca^{2+} . Esta disfunción mitocondrial provoca una importante reducción en el mecanismo del SOCE y un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal mantenida en el tiempo, sin activar la entrada en apoptosis.
6. El déficit de frataxina causa alteraciones en el citoesqueleto de las neuronas sensitivas que aparece desorganizado y acumulado a lo largo de las neuritas formando parte de los esferoides axonales. La sobrecarga de Ca^{2+} citosólica que encontramos en las neuronas deficientes en frataxina no está asociada a una activación de la calpaína. Por tanto, los defectos observados en el citoesqueleto no vienen determinados por esta enzima.

7. La distrofia axonal presente en las neuronas sensitivas deficientes en frataxina *in vitro*, sugiere que el sitio de inicio de la degeneración *dying back* en la fisiopatología de la FRDA es multifocal a lo largo del axón periférico. La causa es la acumulación observada, en múltiples focos, de mitocondria disfuncional y dismórfica asociada a un bloqueo del flujo autofágico y del transporte axonal.

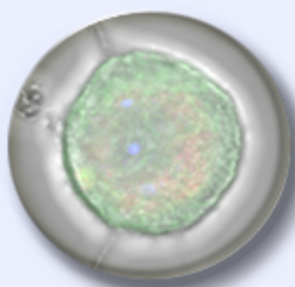
8. El déficit de frataxina genera en el ganglio dorsal del modelo murino FRDA, YG8R, un perfil proteico alterado. Causa la disminución de proteínas de la vía OXPHOS y de sistemas antioxidantes, reforzando la teoría de la disfunción mitocondrial por fallo energético y estrés oxidativo. También causa un gran defecto de proteínas G, segundos mensajeros y efectores de vías de señalización de GPCR y la disminución de proteínas que responden al Ca^{2+} como calpaína, calmodulina y calcineurina.

9. Se han identificación dos nuevos marcadores de neuronas propioceptivas del ganglio dorsal en ratón adulto, PAC1R y GALR1, pertenecientes a la familia de GPCR de clase II. El hecho de que las neuronas del ganglio dorsal del ratón YG8R presenten una alteración en los niveles de proteínas relacionadas con la vía de supervivencia PACAP/PAC1R, sugiere un posible defecto en la activación de esta vía, implicándola en la especificidad del tipo celular afectado en la FRDA.

10. Las neuronas sensitivas del modelo murino FRDA, YG8R, tratadas *in vitro* con quelantes del calcio e inhibidores de metaloproteasas revierten las alteraciones de la red mitocondrial y la formación de esferoides axonales, sugiriendo que la disminución de los niveles de Ca^{2+} citosólico y la inhibición de metaloproteasas podrían evitar la degeneración *dying back* en la fisiopatología de la FRDA.

11. Las neuronas sensitivas del ratón YG8R, tratadas con inhibidores de PDE recuperan los niveles de Ca^{2+} citosólicos, revierten las alteraciones de la red mitocondrial y la formación de esferoides axonales, sugiriendo que el aumento de cAMP y/o cGMP podrían evitar la degeneración *dying back* en la fisiopatología de la FRDA.

Anexos



ANEXOS

ANEXO I: PESO CORPORAL

Resumen del procesamiento de los casos. Media, SEM y número de medidas por genotipo y edad del peso corporal.

Edad (meses)	C57BL/6J macho			YG8R macho			YG8YG8R macho		
	MEDIA	SEM	N	MEDIA	SEM	N	MEDIA	SEM	N
3	28,26	0,25	107	28,77	0,42	57	28,29	0,51	37
6	32,06	0,27	129	34,70	0,59	69	34,64	0,84	38
9	33,84	0,34	123	36,69	0,67	65	38,99	1,07	32
12	35,61	0,41	126	38,64	0,53	77	39,25	1,00	40
15	35,71	0,41	121	39,24	0,60	72	39,77	1,04	41
18	34,24	0,37	109	38,18	0,70	52	38,37	1,19	26
21	32,93	0,30	106	36,57	0,70	38	36,48	0,89	21
24	31,95	0,51	93	34,15	0,88	33	35,45	1,23	15

Edad (meses)	C57BL/6J hembra			YG8R hembra			YG8YG8R hembra		
	MEDIA	SEM	N	MEDIA	SEM	N	MEDIA	SEM	N
3	21,22	0,18	74	21,87	0,42	43	22,44	0,46	48
6	23,66	0,20	87	24,92	0,50	49	25,12	0,49	50
9	25,64	0,32	79	27,54	0,59	61	27,56	0,56	50
12	28,47	0,44	98	29,44	0,64	75	30,71	0,61	58
15	29,71	0,44	93	31,16	0,72	74	31,62	0,66	58
18	30,52	0,51	94	31,20	0,92	57	31,33	0,90	35
21	29,98	0,46	86	30,48	1,50	30	28,91	0,57	37
24	28,24	0,52	63	27,35	0,69	24	26,98	0,56	29

Comparación por pares, ajustes para comparaciones múltiples Bonferroni y **contraste univariado**, en el que cada prueba F contrasta el efecto del genotipo sobre el peso corporal a cada una de las edades.

EDAD	Comparación por pares machos ^a			Contraste univariado ^b	
	GENOTIPO	GENOTIPO	Sig.*	F	Sig.
3 meses	C57BL/6J	YG8R	1	0.536	0.658
		YG8YG8R	1		
	Y8GR	YG8YG8R	1		
6 meses	C57BL/6J	YG8R	0.001**	6.243	0.000***
		YG8YG8R	0.015*		
	Y8GR	YG8YG8R	1		
9 meses	C57BL/6J	YG8R	0.000***	14.014	0.000***
		YG8YG8R	0.000***		
	Y8GR	YG8YG8R	0.126		
12 meses	C57BL/6J	YG8R	0.000***	13.102	0.000***
		YG8YG8R	0.000***		
	Y8GR	YG8YG8R	1		
15 meses	C57BL/6J	YG8R	0.000***	15.301	0.000***
		YG8YG8R	0.000***		
	Y8GR	YG8YG8R	1		
18 meses	C57BL/6J	YG8R	0.000***	20.05	0.000***
		YG8YG8R	0.000***		
	Y8GR	YG8YG8R	1		
21 meses	C57BL/6J	YG8R	0.000***	9.619	0.000***
		YG8YG8R	0.008**		
	Y8GR	YG8YG8R	1		
24 meses	C57BL/6J	YG8R	0.11	3.663	0.012*
		YG8YG8R	0.038*		
	Y8GR	YG8YG8R	1		

EDAD	Comparación por pares hembras ^a			Contraste univariado ^b	
	GENOTIPO	GENOTIPO	Sig.*	F	Sig.
3 meses	C57BL/6J	YG8R	1	0.905	0.438
		YG8YG8R	0.809		
	Y8GR	YG8YG8R	1		
6 meses	C57BL/6J	YG8R	0.667	1.499	0.213
		YG8YG8R	0.38		
	Y8GR	YG8YG8R	1		
9 meses	C57BL/6J	YG8R	0.07	2.953	0.032*
		YG8YG8R	0.097		
	Y8GR	YG8YG8R	1		
12 meses	C57BL/6J	YG8R	0.819	3.942	0.008**
		YG8YG8R	0.014*		
	Y8GR	YG8YG8R	0.678		
15 meses	C57BL/6J	YG8R	0.216	2.638	0.048*
		YG8YG8R	0.062		
	Y8GR	YG8YG8R	1		
18 meses	C57BL/6J	YG8R	1	1.392	0.244
		YG8YG8R	1		
	Y8GR	YG8YG8R	1		
21 meses	C57BL/6J	YG8R	1	2.02	0.109
		YG8YG8R	1		
	Y8GR	YG8YG8R	0.906		
24 meses	C57BL/6J	YG8R	1	0.893	0.444
		YG8YG8R	1		
	Y8GR	YG8YG8R	1		
		YG8YG8R	0.015*		
	Y8GR	YG8YG8R	1		

^a ajuste para comparaciones múltiples de Bonferroni entre los genotipos por pares a cada edad indica que el genotipo YG8R e YG8YG8R poseen un efecto significativo sobre el peso corporal con respecto al control C57BL/6J. No hay diferencias significativas entre los genotipos YG8R e YG8YG8R a ninguna de las edades; ^b Cada prueba F contrasta el efecto de GENOTIPO en cada una de las edades sobre la variable dependiente peso corporal; *nivel de significación * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

ANEXO II: Curvas de supervivencia por Kaplan-Meier

Resumen del procesamiento de los casos. Total del número de ratones por genotipo y sexo. Los sujetos censurados son los que llegan vivos a los 22 meses de edad y se sacrifican para experimentación. Las muertes o eventos son los que han fallecido por muerte natural antes de los 22 meses de edad.

	C57BL/6J	YG8R	YG8YG8R	C57BL/6J	YG8R	YG8YG8R
	macho	macho	macho	hembra	hembra	hembra
Total ratones	131	91	41	88	71	56
Sujetos censurados	98	64	24	65	50	42
Muertes o eventos	33	27	17	23	21	14
Supervivencia media	No definida	No definida	No definida	No definida	No definida	No definida

Tabla de supervivencia. Proporciones de supervivencia a cada edad por genotipo y sexo.

Edad (meses)	C57BL/6J	YG8R	YG8YG8R	C57BL/6J	YG8R	YG8YG8R
	macho	macho	macho	hembra	hembra	hembra
0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
1					98,59	
2					97,18	
3	99,23	98,90		98,86		
4				97,72		98,21
7	98,47					
9	97,70	97,80				
10				95,45		
11		96,70				
13		94,50		94,31		
15	96,94	93,40				
16	95,41			92,04	95,774	
17	94,65	91,20	97,56	90,90		
18	90,83		92,68	89,77	94,36	96,42
19	88,54	89,01	82,92	87,50	90,14	94,64
20	83,96	83,51	70,73		81,69	85,71
21	80,91	75,82	65,85	81,81	74,64	80,35
22	74,80	70,32	58,53	73,86	70,42	75,00

Tabla de supervivencia. Número de animales que sobreviven en cada una de las edades por genotipo y sexo.

Edad (meses)	C57BL/6J	YG8R	YG8YG8R	C57BL/6J	YG8R	YG8YG8R
	macho	macho	macho	hembra	hembra	hembra
0	131	91	41	88	71	56
1					71	
2					70	
3	131	91		88		
4				87		56
7	130					
9	129	90				
10				86		
11		89				
13		88		84		
15	128	86				
16	127			83	69	
17	125	85	41	81		
18	124		40	80	68	55
19	119	83	38	79	67	54
20	116	81	34		64	53
21	110	76	29	77	58	48
22	106	69	27	72	53	45

Comparación por pares de las curvas de supervivencia. Comparación de las curvas de supervivencia entre genotipos y sexos."Log-rank (Mantel-Cox) Test"

Comparación por pares					
SEXO	GENOTIPO	GENOTIPO	Chi-cuadrado	P valor	Hazard Ratio
MACHOS	C57BL/6J	YG8R	0.5253	0.4686	0.8233
		YG8YG8R	3.862	0.0494*	0.5065
	Y8GR	YG8YG8R	1.749	0.186	0.6385
HEMBRAS	C57BL/6J	YG8R	0.2451	0.6206	0.8576
		YG8YG8R	0.03429	0.8531	1.066
	Y8GR	YG8YG8R	0.4028	0.5256	1.248

Codificación de las variables categóricas en la regresión de Cox. Para el genotipo se crean dos variables *dummy*: 1 para el YG8R y 2 para el YG8YG8R frente al control C57BL/6J.

Codificaciones de variables categóricas^{a,c}

		Frecuencia	(1)	(2)
GENOTIPO ^b	0=C57BL/6J	220	-,333	-,333
	1=YG8R	143	,667	-,333
	2=YG8YG8R	96	-,333	,667
SEXO ^b	1=MACHO	247	-,500	
	2=HEMBRA	212	,500	

- a. Variable de categoría: GENOTIPO
b. Codificación de parámetros simples
c. Variable de categoría: SEXO

Variabes en la ecuación en la regresión de Cox. Análisis unifactorial que muestra el riesgo que cada una de las variables ejerce sobre la supervivencia.

	Wald	P valor	Exp(B)
GENOTIPO	0.695	0.706	
GENOTIPO (1)	0.128	0.720	1.079
GENOTIPO (2)	0.695	0.404	1.211
SEXO	0.316	0.574	0.893
PESO	4.785	0.029*	1.034
GENOTIPO*SEXO	2.058	0.357	
GENOTIPO (1)*SEXO	0.666	0.414	0.716
GENOTIPO (2)*SEXO	1.980	0.159	0.529

Coefficientes de regresión entre las variables introducidas en la regresión de Cox. Cuando dos variables tienen una relación lineal el coeficiente de regresión tiende a 1. Las variables introducidas en el modelo de regresión de Cox no deben presentar colinealidad.

Matriz de correlación entre coeficientes de regresión

	GENOTIPO(1)	GENOTIPO(2)	SEXO	PESO	GENOTIPO (1)*SEXO
GENOTIPO(2)	,423				
SEXO	-,096	-,073			
PESO	-,263	-,166	,424		
GENOTIPO(1)*SEXO	,170	,068	,088	,015	
GENOTIPO(2)*SEXO	,053	,114	,233	,060	,399

Regresión de Cox por pasos hacia adelante. El modelo va eliminando paso a paso aquellas variables que no tienen significación en la supervivencia y se quedando con las variables de riesgo para la supervivencia.

Modelo si se elimina el término

Término eliminado	Chi-cuadrado de la pérdida	gl	Sig.
Paso 0 GENOTIPO	,684	2	,710
SEXO	,318	1	,573
PESO	4,270	1	,039
GENOTIPO*SEXO	2,047	2	,359
Paso 1 SEXO	,257	1	,612
PESO	5,240	1	,022
GENOTIPO*SEXO	2,295	2	,317
Paso 2 PESO	7,807	1	,005
GENOTIPO*SEXO	2,042	2	,360
Paso 3 PESO	7,350	1	,007

ANEXO III: TEST LOCOMOTORES

Resumen del procesamiento de los casos. Media, SEM y número de medidas por genotipo y edad del tiempo de latencia del rotarod.

Edad (meses)	C57BL/6J			YG8R			YG8YG8R		
	MEDIA	SEM	N	MEDIA	SEM	N	MEDIA	SEM	N
2	94,75	10,12334	3	75,84	10,94424	8	83,10	16,16026	5
3	90,03	5,715014	25	81,48	8,099343	11	89,43	10,44312	13
4	112,43	6,489654	25	74,28	10,27057	14	90,58	8,697273	17
5	100,16	7,650285	25	68,34	6,948907	14	85,47	8,848849	17
6	104,38	8,324269	25	54,38	5,327977	14	76,00	9,684267	18
7	101,85	7,865069	25	57,52	7,598585	14	68,51	9,04562	18
8	100,43	9,252514	25	50,06	7,887757	14	60,98	10,93419	18
9	94,82	8,111104	25	54,48	9,655593	14	52,72	8,429276	18

Comparación por pares, ajustes para comparaciones múltiples Bonferroni y **contraste univariado**, en el que cada prueba F contrasta el efecto del genotipo en el tiempo de latencia del rotarod.

EDAD	Comparación por pares ^a			Contraste univariado ^b	
	GENOTIPO	GENOTIPO	Sig.*	F	Sig.
2 meses	C57BL/6J	YG8R	1	0.296	0.744
		YG8YG8R	1		
	Y8GR	YG8YG8R	1		
3 meses	C57BL/6J	YG8R	1	0.222	0.801
		YG8YG8R	1		
	Y8GR	YG8YG8R	1		
4 meses	C57BL/6J	YG8R	0.006**	5.151	0.006**
		YG8YG8R	0.176		
	Y8GR	YG8YG8R	0.656		
5 meses	C57BL/6J	YG8R	0.029*	3.427	0.033*
		YG8YG8R	0.609		
	Y8GR	YG8YG8R	0.589		
6 meses	C57BL/6J	YG8R	0.000***	8.841	0.000***
		YG8YG8R	0.038*		
	Y8GR	YG8YG8R	0.296		
7 meses	C57BL/6J	YG8R	0.001**	8.8237	0.000***
		YG8YG8R	0.009**		
	Y8GR	YG8YG8R	1		
8 meses	C57BL/6J	YG8R	0.000***	10.56	0.000***
		YG8YG8R	0.002**		
	Y8GR	YG8YG8R	1		
9 meses	C57BL/6J	YG8R	0.003**	8.926	0.000***
		YG8YG8R	0.002**		
	Y8GR	YG8YG8R	1		

^a ajuste para comparaciones múltiples de Bonferroni entre los genotipos por pares a cada edad indica que el genotipo YG8R y YG8YG8R poseen un efecto significativo sobre el tiempo de latencia del Rotarod con respecto al control C57BL/6J. No hay diferencias significativas entre los genotipos YG8R y YG8YG8R a

ninguna de las edades; ^b Cada prueba F contrasta el efecto de GENOTIPO en cada una de las edades sobre la variable dependiente tiempo de latencia del Rotarod; *nivel de significación *p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.001.

Resumen del procesamiento de los casos. Media, SEM y número de medidas por genotipo y edad del peso corporal durante los meses que se realizó la prueba del rotarod.

Edad (meses)	C57BL/6J			YG8R			YG8YG8R		
	MEDIA	SEM	N	MEDIA	SEM	N	MEDIA	SEM	N
3	20,89	0,2709809	25	23,36	0,7592494	13	22,30	0,5925172	18
6	24,17	0,455819	24	27,60	1,014185	14	26,37	0,9178621	18
9	25,95	0,7330784	25	28,62	1,068437	14	27,99	0,8911501	18

Comparación por pares, ajustes para comparaciones múltiples Bonferroni y **contraste univariado**, en el que cada prueba F contrasta el efecto del genotipo en el peso corporal durante los meses que se realizó la prueba del rotarod.

EDAD	Comparación por pares ^a			Contraste univariado ^b	
	GENOTIPO	GENOTIPO	Sig.*	F	Sig.
3 meses	C57BL/6J	YG8R	0.097	2.725	0.067
		YG8YG8R	0.269		
	Y8GR	YG8YG8R	1		
6 meses	C57BL/6J	YG8R	0.008**	3.318	0.038
		YG8YG8R	0.115		
	Y8GR	YG8YG8R	1		
9 meses	C57BL/6J	YG8R	0.020*	2.325	0.099
		YG8YG8R	0.721		
	Y8GR	YG8YG8R	0.974		

Resumen del procesamiento de los casos. Media, SEM y número de medidas por genotipo y edad del tiempo en cruzar la barrad e equilibrio de 26 mm.

Edad (meses)	C57BL/6J			YG8R			YG8YG8R		
	MEDIA	SEM	N	MEDIA	SEM	N	MEDIA	SEM	N
10	9,21	1,06	24	18,64	3,62	14	18,50	3,36	18
11	14,13	1,79	24	30,00	4,47	14	30,00	3,39	18
12	14,70	2,32	24	28,57	2,74	14	25,89	2,93	18
13	18,52	2,97	24	36,57	3,92	14	27,33	3,06	18
14	20,55	2,83	24	39,21	4,15	14	26,22	3,23	18
15	27,41	3,33	24	43,79	3,92	14	30,00	3,99	18

Comparación por pares, ajustes para comparaciones múltiples Bonferroni y **contraste univariado**, en el que cada prueba F contrasta el efecto del genotipo en el tiempo en cruzar la barra de equilibrio de 26 mm de ancho.

EDAD	Comparación por pares ^a			Contraste univariado ^b	
	GENOTIPO	GENOTIPO	Sig.*	F	Sig.
10 meses	C57BL/6J	YG8R	0.126	3.16	0.043*
		YG8YG8R	0.093		
	Y8GR	YG8YG8R	1		
11 meses	C57BL/6J	YG8R	0.002**	9.099	0.000***
		YG8YG8R	0.001**		
	Y8GR	YG8YG8R	1		
12 meses	C57BL/6J	YG8R	0.012*	5.101	0.006**
		YG8YG8R	0.038*		
	Y8GR	YG8YG8R	1		
13 meses	C57BL/6J	YG8R	0.000***	7.59	0.001**
		YG8YG8R	0.127		
	Y8GR	YG8YG8R	0.181		
14 meses	C57BL/6J	YG8R	0.000***	7.929	0.000***
		YG8YG8R	0.586		
	Y8GR	YG8YG8R	0.025*		
15 meses	C57BL/6J	YG8R	0.002**	6.492	0.002**
		YG8YG8R	1		
	Y8GR	YG8YG8R	0.015*		

^a ajuste para comparaciones múltiples de Bonferroni entre los genotipos por pares a cada edad indica que el genotipo YG8R e YG8YG8R poseen un efecto significativo sobre el tiempo en cruzar la barra de equilibrio de 26 mm de ancho con respecto al control C57BL/6J. No hay diferencias significativas entre los genotipos YG8R e YG8YG8R a ninguna de las edades; ^b Cada prueba F contrasta el efecto de GENOTIPO en cada una de las edades sobre la variable dependiente tiempo en cruzar la barra de equilibrio de 26 mm de ancho. *nivel de significación *p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.001.

Resumen del procesamiento de los casos. Media, SEM y número de medidas por genotipo y edad del tiempo en cruzar la barra de equilibrio de 12 mm.

Edad (meses)	C57BL/6J			YG8R			YG8YG8R		
	MEDIA	SEM	N	MEDIA	SEM	N	MEDIA	SEM	N
10	13,17	1,08	24	27,21	3,72	14	19,89	2,52	18
11	15,46	1,53	24	38,14	4,98	14	36,00	4,27	18
12	17,95	2,03	24	41,29	4,29	14	33,67	3,40	18
13	24,09	2,58	24	42,43	3,66	14	33,89	3,10	18
14	25,14	3,23	24	44,43	3,91	14	37,50	3,18	18
15	25,09	2,30	24	39,14	3,86	14	36,38	3,68	18

Comparación por pares, ajustes para comparaciones múltiples Bonferroni y **contraste univariado**, en el que cada prueba F contrasta el efecto del genotipo en el tiempo en cruzar la barra de equilibrio de 12 mm de ancho.

EDAD	Comparación por pares ^a			Contraste univariado ^b	
	GENOTIPO	GENOTIPO	Sig.*	F	Sig.
10 meses	C57BL/6J	YG8R	0.008**	4.671	0.010*
		YG8YG8R	0.354		
		Y8GR	0.408		
11 meses	C57BL/6J	YG8R	0.000***	16.753	0.000***
		YG8YG8R	0.000***		
		Y8GR	1		
12 meses	C57BL/6J	YG8R	0.000***	12.963	0.000***
		YG8YG8R	0.001**		
		Y8GR	0.363		
13 meses	C57BL/6J	YG8R	0.000***	7.969	0.000***
		YG8YG8R	0.072		
		Y8GR	0.247		
14 meses	C57BL/6J	YG8R	0.000***	9.13	0.000***
		YG8YG8R	0.015*		
		Y8GR	0.476		
15 meses	C57BL/6J	YG8R	0.009**	5.502	0.004**
		YG8YG8R	0.031*		
		Y8GR	1		

^a ajuste para comparaciones múltiples de Bonferroni entre los genotipos por pares a cada edad indica que el genotipo YG8R e YG8YG8R poseen un efecto significativo sobre el tiempo en cruzar la barra de equilibrio de 12 mm de ancho con respecto al control C57BL/6J. No hay diferencias significativas entre los genotipos YG8R e YG8YG8R a ninguna de las edades; ^b Cada prueba F contrasta el efecto de GENOTIPO en cada una de las edades sobre la variable dependiente tiempo en cruzar la barra de equilibrio de 12 mm de ancho. *nivel de significación *p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.001.

Resumen del procesamiento de los casos. Media, SEM y número de medidas por genotipo y edad del tiempo en cruzar la barra de equilibrio de 5 mm.

Edad (meses)	C57BL/6J			YG8R			YG8YG8R		
	MEDIA	SEM	N	MEDIA	SEM	N	MEDIA	SEM	N
10	26,79	2,69	24	32,21	4,16	14	35,22	3,46	18
11	28,46	2,83	24	47,14	3,94	14	46,56	3,37	18
12	32,55	2,92	24	44,00	3,73	14	39,94	3,40	18
13	40,22	3,09	24	44,86	4,18	14	42,17	3,94	18
14	37,86	3,27	24	51,21	3,62	14	45,33	4,07	18
15	44,41	3,49	24	51,64	2,98	14	47,11	3,93	18

Comparación por pares, ajustes para comparaciones múltiples Bonferroni y **contraste univariado**, en el que cada prueba F contrasta el efecto del genotipo en el tiempo en cruzar la barra de equilibrio de 5 mm de ancho.

EDAD	Comparación por pares ^a			Contraste univariado ^b	
	GENOTIPO	GENOTIPO	Sig.*	F	Sig.
10 meses	C57BL/6J	YG8R	0.727	2.015	0.134
		YG8YG8R	0.15		
	Y8GR	YG8YG8R	1		
11 meses	C57BL/6J	YG8R	0.000***	12.17	0.000***
		YG8YG8R	0.000***		
	Y8GR	YG8YG8R	1		
12 meses	C57BL/6J	YG8R	0.052	3.065	0.047*
		YG8YG8R	0.297		
	Y8GR	YG8YG8R	1		
13 meses	C57BL/6J	YG8R	0.963	0.494	0.61
		YG8YG8R	1		
	Y8GR	YG8YG8R	1		
14 meses	C57BL/6J	YG8R	0.014*	4.179	0.016*
		YG8YG8R	0.265		
	Y8GR	YG8YG8R	0.694		
15 meses	C57BL/6J	YG8R	0.375	1.179	0.308
		YG8YG8R	1		
	Y8GR	YG8YG8R	1		

^a ajuste para comparaciones múltiples de Bonferroni entre los genotipos por pares a cada edad indica que el genotipo YG8R y YG8YG8R poseen un efecto significativo sobre el tiempo en cruzar la barra de equilibrio de 5 mm de ancho con respecto al control C57BL/6J. No hay diferencias significativas entre los genotipos YG8R y YG8YG8R a ninguna de las edades; ^b Cada prueba F contrasta el efecto de GENOTIPO en cada una de las edades sobre la variable dependiente tiempo en cruzar la barra de equilibrio de 5 mm de ancho. *nivel de significación $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

Resumen del procesamiento de los casos. Media, SEM y número de medidas por genotipo y edad del peso corporal durante los meses que se realizó la prueba de la barra del equilibrio.

Edad (meses)	C57BL/6J			YG8R			YG8YG8R		
	MEDIA	SEM	N	MEDIA	SEM	N	MEDIA	SEM	N
10	25,92917	0,6973158	24	29,51429	1,079421	14	28,35555	1,064895	18
11	26,86667	0,8178415	24	30,30714	1,077363	14	29,53333	1,051143	18
12	27,840	1,137805	20	31,16429	1,069744	14	30,59444	1,067722	18
13	28,42174	1,131859	23	31,59286	0,9879752	14	31,77778	1,077171	18
14	29,30455	1,181284	22	32,14286	1,109337	14	32,31667	1,088329	18
15	28,300	1,120645	22	31,80714	1,146541	14	31,82778	1,167333	18

Comparación por pares, ajustes para comparaciones múltiples Bonferroni y **contraste univariado**, en el que cada prueba F contrasta el efecto del genotipo en el peso corporal durante los meses que se realizó la prueba de la barra de equilibrio.

EDAD	Comparación por pares ^a			Contraste univariado ^b	
	GENOTIPO	GENOTIPO	Sig.*	F	Sig.
10 meses	C57BL/6J	YG8R	0.06	3.076	0.047*
		YG8YG8R	0.267		
		Y8GR	1		
11 meses	C57BL/6J	YG8R	0.076	3.076	0.047*
		YG8YG8R	0.185		
		Y8GR	1		
12 meses	C57BL/6J	YG8R	0.112	2.718	0.067
		YG8YG8R	0.192		
		Y8GR	1		
13 meses	C57BL/6J	YG8R	0.092	3.607	0.028*
		YG8YG8R	0.06		
		Y8GR	1		
14 meses	C57BL/6J	YG8R	0.209	2.694	0.068
		YG8YG8R	0.115		
		Y8GR	1		
15 meses	C57BL/6J	YG8R	0.075	3.862	0.021*
		YG8YG8R	0.046*		
		Y8GR	1		

^a ajuste para comparaciones múltiples de Bonferroni entre los genotipos por pares a cada edad indica que el genotipo YG8R e YG8YG8R poseen un efecto significativo sobre el tiempo en cruzar la barra de equilibrio de 5 mm de ancho con respecto al control C57BL/6J. No hay diferencias significativas entre los genotipos YG8R e YG8YG8R a ninguna de las edades; ^b Cada prueba F contrasta el efecto de GENOTIPO en cada una de las edades sobre la variable dependiente tiempo en cruzar la barra de equilibrio de 5 mm de ancho. *nivel de significación * $p < 0.05$.

Resumen del procesamiento de los casos. Tabla de frecuencias con el número de veces en las que los ratones se quedan en lo alto del palo o giran y descienden por edad y genotipo.

Edad (meses)	C57BL/6J		YG8R		YG8YG8R	
	Parada en lo alto del palo	Gira y desciende	Parada en lo alto del palo	Gira y desciende	Parada en lo alto del palo	Gira y desciende
10	5	110	5	65	4	86
11	16	99	21	49	15	75
12	33	82	29	41	33	57
13	37	78	36	34	35	55
14	56	54	43	27	42	48
15	67	43	48	22	40	50

Comparación por pares de la prueba del palo. Comparación de la proporción de ratones que se quedan en lo alto del palo sin descender. Tabla de contingencia 2x2 y test exacto de Fisher.

Edad (meses)	Comparación por pares				
	GENOTIPO	GENOTIPO	P valor	Relative Risk	Odds ratio
10	C57BL/6J	YG8R	0.5073	0.6087	0.5909
		YG8YG8R	1	0.9783	0.9773
	Y8GR	YG8YG8R	0.5061	1.607	1.654
11	C57BL/6J	YG8R	0.0130*	0.4638	0.3771
		YG8YG8R	0.695	0.8348	0.8081
	Y8GR	YG8YG8R	0.0566	1.8	2.143
12	C57BL/6J	YG8R	0.0801	0.6927	0.569
		YG8YG8R	0.2327	0.7826	0.6951
	Y8GR	YG8YG8R	0.6241	1.13	1.222
13	C57BL/6J	YG8R	0.0129*	0.6256	0.448
		YG8YG8R	0.3767	0.8273	0.7454
	Y8GR	YG8YG8R	0.1487	1.322	1.664
14	C57BL/6J	YG8R	0.2188	0.8288	0.6512
		YG8YG8R	0.5722	1.091	1.185
	Y8GR	YG8YG8R	0.0792	1.316	1.82
15	C57BL/6J	YG8R	0.3411	0.8883	0.7141
		YG8YG8R	0.0231*	1.37	1.948
	Y8GR	YG8YG8R	0.0025**	1.543	2.727

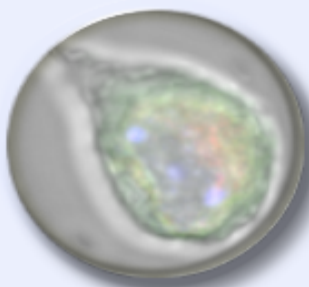
Resumen del procesamiento de los casos. Media, SEM y número de medidas por genotipo y edad del peso corporal durante los meses que se realizó la prueba del palo.

Edad (meses)	C57BL/6J			YG8R			YG8YG8R		
	MEDIA	SEM	N	MEDIA	SEM	N	MEDIA	SEM	N
10	25,99	0,7207564	24	29,65	107,093	14	28,70	0,9579208	18
11	27,29	0,9597735	23	31,02	1,208,813	14	30,51	1,036,404	18
12	27,95	1,004,512	23	31,50	1,099,324	14	31,38	1,115,719	18
13	28,25	1,136,161	23	32,44	1,130,288	14	32,02	112,327	18
14	28,59	1,140,564	22	32,13	1,094,924	14	31,77	1,343,261	18
15	28,86	1,140,774	22	31,33	0,8261261	14	31,91	121,935	18

Comparación por pares, ajustes para comparaciones múltiples Bonferroni y **contraste univariado**, en el que cada prueba F contrasta el efecto del genotipo en el peso corporal durante los meses que se realizó la prueba del palo.

EDAD	Comparación por pares ^a			Contraste univariado ^b	
	GENOTIPO	GENOTIPO	Sig.*	F	Sig.
10 meses	C57BL/6J	YG8R	0.097	2.725	0.067
		YG8YG8R	0.269		
	Y8GR	YG8YG8R	1		
11 meses	C57BL/6J	YG8R	0.078	3.318	0.038
		YG8YG8R	0.115		
	Y8GR	YG8YG8R	1		
12 meses	C57BL/6J	YG8R	0.102	2.325	0.099
		YG8YG8R	0.721		
	Y8GR	YG8YG8R	0.974		
13 meses	C57BL/6J	YG8R	0.038*	4.344	0.014*
		YG8YG8R	0.047*		
	Y8GR	YG8YG8R	1		
14 meses	C57BL/6J	YG8R	0.108	3.025	0.05
		YG8YG8R	0.128		
	Y8GR	YG8YG8R	1		
15 meses	C57BL/6J	YG8R	0.428	2.166	0.116
		YG8YG8R	0.155		
	Y8GR	YG8YG8R	1		

BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFÍA

1. Harding, A.E., *Friedreich's ataxia: a clinical and genetic study of 90 families with an analysis of early diagnostic criteria and intrafamilial clustering of clinical features*. Brain, 1981. **104**(3): p. 589-620.
2. Polo, J.M., et al., *Hereditary ataxias and paraplegias in Cantabria, Spain. An epidemiological and clinical study*. Brain, 1991. **114 (Pt 2)**: p. 855-66.
3. Koeppen, A.H., *Friedreich's ataxia: pathology, pathogenesis, and molecular genetics*. J Neurol Sci, 2011. **303**(1-2): p. 1-12.
4. Gonzalez-Cabo, P. and F. Palau, *Mitochondrial pathophysiology in Friedreich's ataxia*. J Neurochem, 2013. **126 Suppl 1**: p. 53-64.
5. Koeppen, A.H., *Nikolaus Friedreich and degenerative atrophy of the dorsal columns of the spinal cord*. J Neurochem, 2013. **126 Suppl 1**: p. 4-10.
6. Palau, F., *Friedreich's ataxia and frataxin: molecular genetics, evolution and pathogenesis (Review)*. Int J Mol Med, 2001. **7**(6): p. 581-9.
7. Pandolfo, M., *The molecular basis of Friedreich ataxia*. Adv Exp Med Biol, 2002. **516**: p. 99-118.
8. Campuzano, V., et al., *Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion*. Science, 1996. **271**(5254): p. 1423-7.
9. Koutnikova, H., et al., *Studies of human, mouse and yeast homologues indicate a mitochondrial function for frataxin*. Nat Genet, 1997. **16**(4): p. 345-351.
10. Xia, H., et al., *Novel frataxin isoforms may contribute to the pathological mechanism of Friedreich ataxia*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e47847.
11. Condo, I., et al., *A pool of extramitochondrial frataxin that promotes cell survival*. J Biol Chem, 2006. **281**(24): p. 16750-6.
12. Schulz, J.B., et al., *Oxidative stress in patients with Friedreich ataxia*. Neurology, 2000. **55**(11): p. 1719-21.
13. Bradley, J.L., et al., *Role of oxidative damage in Friedreich's ataxia*. Neurochem Res, 2004. **29**(3): p. 561-7.
14. Al-Mahdawi, S., et al., *GAA repeat expansion mutation mouse models of Friedreich ataxia exhibit oxidative stress leading to progressive neuronal and cardiac pathology*. Genomics, 2006. **88**(5): p. 580-90.
15. Vazquez-Manrique, R.P., et al., *Reduction of Caenorhabditis elegans frataxin increases sensitivity to oxidative stress, reduces lifespan, and causes lethality in a mitochondrial complex II mutant*. FASEB J, 2006. **20**(1): p. 172-4.
16. Llorens, J.V., et al., *Causative role of oxidative stress in a Drosophila model of Friedreich ataxia*. FASEB J, 2007. **21**(2): p. 333-44.
17. Garcia-Gimenez, J.L., et al., *Differential expression of PGC-1alpha and metabolic sensors suggest age-dependent induction of mitochondrial biogenesis in Friedreich ataxia fibroblasts*. PLoS One, 2011. **6**(6): p. e20666.

18. Bolinches-Amoros, A., et al., *Mitochondrial dysfunction induced by frataxin deficiency is associated with cellular senescence and abnormal calcium metabolism*. *Front Cell Neurosci*, 2014. **8**: p. 124.
19. Adamec, J., et al., *Iron-dependent self-assembly of recombinant yeast frataxin: implications for Friedreich ataxia*. *Am J Hum Genet*, 2000. **67**(3): p. 549-62.
20. Nichol, H., et al., *Structure of frataxin iron cores: an X-ray absorption spectroscopic study*. *Biochemistry*, 2003. **42**(20): p. 5971-6.
21. Park, S., et al., *Yeast frataxin sequentially chaperones and stores iron by coupling protein assembly with iron oxidation*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(33): p. 31340-51.
22. Gerber, J., U. Muhlenhoff, and R. Lill, *An interaction between frataxin and Isu1/Nfs1 that is crucial for Fe/S cluster synthesis on Isu1*. *EMBO Rep*, 2003. **4**(9): p. 906-11.
23. Lesuisse, E., et al., *Iron use for haeme synthesis is under control of the yeast frataxin homologue (Yfh1)*. *Hum Mol Genet*, 2003. **12**(8): p. 879-89.
24. Yoon, T. and J.A. Cowan, *Iron-sulfur cluster biosynthesis. Characterization of frataxin as an iron donor for assembly of [2Fe-2S] clusters in ISU-type proteins*. *J Am Chem Soc*, 2003. **125**(20): p. 6078-84.
25. Ramazzotti, A., V. Vanmansart, and F. Foury, *Mitochondrial functional interactions between frataxin and Isu1p, the iron-sulfur cluster scaffold protein, in Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, 2004. **557**(1-3): p. 215-20.
26. Yoon, T. and J.A. Cowan, *Frataxin-mediated iron delivery to ferrochelatase in the final step of heme biosynthesis*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(25): p. 25943-6.
27. Bulteau, A.L., et al., *Frataxin acts as an iron chaperone protein to modulate mitochondrial aconitase activity*. *Science*, 2004. **305**(5681): p. 242-245.
28. Lodi, R., et al., *Deficit of in vivo mitochondrial ATP production in patients with Friedreich ataxia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(20): p. 11492-5.
29. Ristow, M., et al., *Frataxin activates mitochondrial energy conversion and oxidative phosphorylation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(22): p. 12239-43.
30. Gonzalez-Cabo, P., et al., *Frataxin interacts functionally with mitochondrial electron transport chain proteins*. *Hum Mol Genet*, 2005. **14**(15): p. 2091-8.
31. Kadenbach, B., *Mitochondrial oxidative phosphorylation: nuclear-encoded genes, enzyme regulation, and Pathophysiology*, in *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2012, Springer, : New York. p. v. digital (XI, 372 p.).
32. Lefevre, S., et al., *Oxidative stress induces mitochondrial fragmentation in frataxin-deficient cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012. **418**(2): p. 336-41.
33. Carletti, B., et al., *Frataxin silencing inactivates mitochondrial Complex I in NSC34 motoneuronal cells and alters glutathione homeostasis*. *Int J Mol Sci*, 2014. **15**(4): p. 5789-806.

34. Pastore, A., et al., *Actin glutathionylation increases in fibroblasts of patients with Friedreich's ataxia: a potential role in the pathogenesis of the disease*. J Biol Chem, 2003. **278**(43): p. 42588-95.
35. Sparaco, M., et al., *Friedreich's ataxia: oxidative stress and cytoskeletal abnormalities*. J Neurol Sci, 2009. **287**(1-2): p. 111-8.
36. Cossee, M., et al., *Inactivation of the Friedreich ataxia mouse gene leads to early embryonic lethality without iron accumulation*. Hum Mol Genet, 2000. **9**(8): p. 1219-1226.
37. Puccio, H., et al., *Mouse models for Friedreich ataxia exhibit cardiomyopathy, sensory nerve defect and Fe-S enzyme deficiency followed by intramitochondrial iron deposits*. Nat Genet, 2001. **27**(2): p. 181-6.
38. Simon, D., et al., *Friedreich ataxia mouse models with progressive cerebellar and sensory ataxia reveal autophagic neurodegeneration in dorsal root ganglia*. J Neurosci, 2004. **24**(8): p. 1987-95.
39. Miranda, C.J., et al., *Frataxin knockin mouse*. FEBS Lett, 2002. **512**(1-3): p. 291-7.
40. Al-Mahdawi, S., et al., *GAA repeat instability in Friedreich ataxia YAC transgenic mice*. Genomics, 2004. **84**(2): p. 301-10.
41. Perdomini, M., et al., *Animal and cellular models of Friedreich ataxia*. J Neurochem, 2013. **126 Suppl 1**: p. 65-79.
42. Richardson, T.E., et al., *Therapeutic strategies in Friedreich's ataxia*. Brain Res, 2013. **1514**: p. 91-7.
43. Parkinson, M.H., J.B. Schulz, and P. Giunti, *Co-enzyme Q10 and idebenone use in Friedreich's ataxia*. J Neurochem, 2013. **126 Suppl 1**: p. 125-41.
44. Pandolfo, M. and L. Hausmann, *Deferiprone for the treatment of Friedreich's ataxia*. J Neurochem, 2013. **126 Suppl 1**: p. 142-6.
45. Gottesfeld, J.M., J.R. Rusche, and M. Pandolfo, *Increasing frataxin gene expression with histone deacetylase inhibitors as a therapeutic approach for Friedreich's ataxia*. J Neurochem, 2013. **126 Suppl 1**: p. 147-54.
46. Libri, V., et al., *Epigenetic and neurological effects and safety of high-dose nicotinamide in patients with Friedreich's ataxia: an exploratory, open-label, dose-escalation study*. Lancet, 2014. **384**(9942): p. 504-13.
47. Mariotti, C., et al., *Erythropoietin in Friedreich ataxia*. J Neurochem, 2013. **126 Suppl 1**: p. 80-7.
48. Gomes, C.M. and R. Santos, *Neurodegeneration in Friedreich's ataxia: from defective frataxin to oxidative stress*. Oxid Med Cell Longev, 2013. **2013**: p. 487534.
49. Koeppen, A.H. and J.E. Mazurkiewicz, *Friedreich ataxia: neuropathology revised*. J Neuropathol Exp Neurol, 2013. **72**(2): p. 78-90.
50. Caspary, T. and K.V. Anderson, *Patterning cell types in the dorsal spinal cord: what the mouse mutants say*. Nat Rev Neurosci, 2003. **4**(4): p. 289-97.

51. Montano, J.A., et al., *Development and neuronal dependence of cutaneous sensory nerve formations: Lessons from neurotrophins*. *Microsc Res Tech*, 2010. **73**(5): p. 513-29.
52. Usoskin, D., et al., *Unbiased classification of sensory neuron types by large-scale single-cell RNA sequencing*. *Nat Neurosci*, 2015. **18**(1): p. 145-53.
53. Deinhardt, K. and M.V. Chao, *Trk receptors*. *Handb Exp Pharmacol*, 2014. **220**: p. 103-19.
54. Saxena, S. and P. Caroni, *Mechanisms of axon degeneration: from development to disease*. *Prog Neurobiol*, 2007. **83**(3): p. 174-91.
55. Klein, R., *Role of neurotrophins in mouse neuronal development*. *FASEB J*, 1994. **8**(10): p. 738-44.
56. Reichardt, L.F., *Neurotrophin-regulated signalling pathways*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2006. **361**(1473): p. 1545-64.
57. Harrington, A.W. and D.D. Ginty, *Long-distance retrograde neurotrophic factor signalling in neurons*. *Nat Rev Neurosci*, 2013. **14**(3): p. 177-87.
58. Blum, R. and A. Konnerth, *Neurotrophin-mediated rapid signaling in the central nervous system: mechanisms and functions*. *Physiology (Bethesda)*, 2005. **20**: p. 70-8.
59. Chao, M.V., *Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways*. *Nat Rev Neurosci*, 2003. **4**(4): p. 299-309.
60. Lee, F.S., R. Rajagopal, and M.V. Chao, *Distinctive features of Trk neurotrophin receptor transactivation by G protein-coupled receptors*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2002. **13**(1): p. 11-7.
61. Hoke, A., *Neuroprotection in the peripheral nervous system: rationale for more effective therapies*. *Arch Neurol*, 2006. **63**(12): p. 1681-5.
62. Luo, L. and D.D. O'Leary, *Axon retraction and degeneration in development and disease*. *Annu Rev Neurosci*, 2005. **28**: p. 127-56.
63. Neukomm, L.J. and M.R. Freeman, *Diverse cellular and molecular modes of axon degeneration*. *Trends in Cell Biology*, 2014. **24**(9): p. 515-523.
64. Raff, M.C., A.V. Whitmore, and J.T. Finn, *Axonal self-destruction and neurodegeneration*. *Science*, 2002. **296**(5569): p. 868-71.
65. Yan, T., Y. Feng, and Q. Zhai, *Axon degeneration: Mechanisms and implications of a distinct program from cell death*. *Neurochem Int*, 2010. **56**(4): p. 529-34.
66. Pease, S.E. and R.A. Segal, *Preserve and protect: maintaining axons within functional circuits*. *Trends Neurosci*, 2014. **37**(10): p. 572-82.
67. Lingor, P., et al., *Axonal degeneration as a therapeutic target in the CNS*. *Cell Tissue Res*, 2012. **349**(1): p. 289-311.
68. Coleman, M., *Axon degeneration mechanisms: commonality amid diversity*. *Nat Rev Neurosci*, 2005. **6**(11): p. 889-98.
69. Conforti, L., J. Gilley, and M.P. Coleman, *Wallerian degeneration: an emerging axon death pathway linking injury and disease*. *Nat Rev Neurosci*, 2014. **15**(6): p. 394-409.

70. Wang, J.T., Z.A. Medress, and B.A. Barres, *Axon degeneration: molecular mechanisms of a self-destruction pathway*. J Cell Biol, 2012. **196**(1): p. 7-18.
71. Coleman, M.P., *The challenges of axon survival: introduction to the special issue on axonal degeneration*. Exp Neurol, 2013. **246**: p. 1-5.
72. Nikic, I., et al., *A reversible form of axon damage in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis*. Nat Med, 2011. **17**(4): p. 495-9.
73. Craner, M.J. and L. Fugger, *Axonal injury in reverse*. Nat Med, 2011. **17**(4): p. 423-6.
74. Ribas, V., C. Garcia-Ruiz, and J.C. Fernandez-Checa, *Glutathione and mitochondria*. Front Pharmacol, 2014. **5**: p. 151.
75. Spinazzi, M., et al., *Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells*. Nat Protoc, 2012. **7**(6): p. 1235-46.
76. Chevalier-Larsen, E. and E.L. Holzbaur, *Axonal transport and neurodegenerative disease*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1762**(11-12): p. 1094-108.
77. Benard, G. and R. Rossignol, *Ultrastructure of the mitochondrion and its bearing on function and bioenergetics*. Antioxid Redox Signal, 2008. **10**(8): p. 1313-42.
78. Haelterman, N.A., et al., *A mitocentric view of Parkinson's disease*. Annu Rev Neurosci, 2014. **37**: p. 137-59.
79. Lenaz, G. and M.L. Genova, *Structure and organization of mitochondrial respiratory complexes: a new understanding of an old subject*. Antioxid Redox Signal, 2010. **12**(8): p. 961-1008.
80. Enriquez, J.A. and G. Lenaz, *Coenzyme q and the respiratory chain: coenzyme q pool and mitochondrial supercomplexes*. Mol Syndromol, 2014. **5**(3-4): p. 119-40.
81. Hroudová, J., Z. Fišar, and J. Raboch, *Mitochondrial Functions in Mood Disorders*, in *Mood Disorders*, P.N. Kocabasoglu, Editor 2013, InTech.
82. Giorgi, C., et al., *Mitochondrial calcium homeostasis as potential target for mitochondrial medicine*. Mitochondrion, 2012. **12**(1): p. 77-85.
83. Quinlan, C.L., et al., *The determination and analysis of site-specific rates of mitochondrial reactive oxygen species production*. Methods Enzymol, 2013. **526**: p. 189-217.
84. Brini, M., et al., *Neuronal calcium signaling: function and dysfunction*. Cell Mol Life Sci, 2014. **71**(15): p. 2787-814.
85. Groschner, K., Graier, W., Romanin, C., *Store-operated Ca²⁺ entry (SOCE) pathways. Emerging signaling concepts in human (patho)physiology*, ed. K. Groschner, Graier, W., Romanin, C.2012.
86. Kubli, D.A. and Å.B. Gustafsson, *Mitochondria and Mitophagy: The Yin and Yang of Cell Death Control*. Circulation Research, 2012. **111**(9): p. 1208-1221.
87. Maday, S., K.E. Wallace, and E.L. Holzbaur, *Autophagosomes initiate distally and mature during transport toward the cell soma in primary neurons*. J Cell Biol, 2012. **196**(4): p. 407-17.

88. Ferguson, C.J., G.M. Lenk, and M.H. Meisler, *Defective autophagy in neurons and astrocytes from mice deficient in PI(3,5)P2*. Hum Mol Genet, 2009. **18**(24): p. 4868-78.
89. Yang, Y., et al., *Autophagy in axonal and dendritic degeneration*. Trends Neurosci, 2013. **36**(7): p. 418-28.
90. Nunes, P. and N. Demaurex, *Redox regulation of store-operated Ca²⁺ entry*. Antioxid Redox Signal, 2014. **21**(6): p. 915-32.
91. Majewski, L. and J. Kuznicki, *SOCE in neurons: Signaling or just refilling?* Biochim Biophys Acta, 2015.
92. Groschner, L.N., et al., *Endothelial mitochondria--less respiration, more integration*. Pflugers Arch, 2012. **464**(1): p. 63-76.
93. Visch, H., J., Koopman, W., J., Zeegers, D., van Emst-de Vries, S., E., van Kuppeveld, F., J., van den Heuvel, L., W., Smeitink, J.,A., Willems, P.,H., *Ca²⁺-mobilizing agonists increase mitochondrial ATP production to accelerate cytosolic Ca²⁺ removal: aberrations in human complex I deficiency*. Am J Physiol Cell Physiol, 2006. **291**(2): p. C308-C316.
94. Gemes, G., et al., *Store-operated Ca²⁺ entry in sensory neurons: functional role and the effect of painful nerve injury*. J Neurosci, 2011. **31**(10): p. 3536-49.
95. Tuteja, N., *Signaling through G protein coupled receptors*. Plant Signal Behav, 2009. **4**(10): p. 942-7.
96. Ritter, S.L. and R.A. Hall, *Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(12): p. 819-30.
97. Martin, B., et al., *Class II G Protein-Coupled Receptors and Their Ligands in Neuronal Function and Protection*. Neuromolecular Med, 2005. **7**(1-2): p. 3-36.
98. Armstrong, B.D., et al., *Impaired nerve regeneration and enhanced neuroinflammatory response in mice lacking pituitary adenylyl cyclase activating peptide*. Neuroscience, 2008. **151**(1): p. 63-73.
99. Zhang, Y.Z., et al., *Pituitary adenylyl cyclase activating peptide expression in the rat dorsal root ganglia: up-regulation after peripheral nerve injury*. Neuroscience, 1996. **74**(4): p. 1099-110.
100. Jongsma, H., et al., *Alteration of PACAP distribution and PACAP receptor binding in the rat sensory nervous system following sciatic nerve transection*. Brain Res, 2000. **853**(2): p. 186-96.
101. Lee, E.H. and S.R. Seo, *Neuroprotective roles of pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide in neurodegenerative diseases*. BMB Rep, 2014. **47**(7): p. 369-75.
102. Kambe, Y. and A. Miyata, *Role of mitochondrial activation in PACAP dependent neurite outgrowth*. J Mol Neurosci, 2012. **48**(3): p. 550-7.
103. Blechman, J. and G. Levkowitz, *Alternative Splicing of the Pituitary Adenylyl Cyclase-Activating Polypeptide Receptor PAC1: Mechanisms of Fine Tuning of Brain Activity*. Front Endocrinol (Lausanne), 2013. **4**: p. 55.

104. Davies, A.M., K.F. Lee, and R. Jaenisch, *p75-deficient trigeminal sensory neurons have an altered response to NGF but not to other neurotrophins*. *Neuron*, 1993. **11**(4): p. 565-74.
105. Hayashi, G., et al., *Frataxin deficiency increases cyclooxygenase 2 and prostaglandins in cell and animal models of Friedreich's ataxia*. *Hum Mol Genet*, 2014. **23**(25): p. 6838-47.
106. Sandi, C., et al., *Prolonged treatment with pimelic o-aminobenzamide HDAC inhibitors ameliorates the disease phenotype of a Friedreich ataxia mouse model*. *Neurobiol Dis*, 2011. **42**(3): p. 496-505.
107. Shan, Y., et al., *Frataxin deficiency leads to defects in expression of antioxidants and Nrf2 expression in dorsal root ganglia of the Friedreich's ataxia YG8R mouse model*. *Antioxid Redox Signal*, 2013. **19**(13): p. 1481-93.
108. Pook, M.A., et al., *Rescue of the Friedreich's ataxia knockout mouse by human YAC transgenesis*. *Neurogenetics*, 2001. **3**(4): p. 185-93.
109. Fernández, M., et al., *Curvas de supervivencia y modelos de regresión: errores y aciertos en la metodología de aplicación*. *NEFROLOGÍA*. Vol. XVI. 1996.
110. Martínez-González, M.A. and J. De Iarala-Estévez, *Análisis de supervivencia y análisis multivariado*, in *Manual de medicina basada en la evidencia*, L.J. F, Editor 2001. p. 213-219.
111. Rich, J.T., et al., *A practical guide to understanding Kaplan-Meier curves*. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2010. **143**(3): p. 331-6.
112. Kaplan, E.L. and P. Meier, *Nonparametric estimation from incomplete observations*, in *Journal of the American Statistical Association* 1958, s.n.: S.I. p. p. 457-481.
113. Cox, D.R. and D. Oakes, *Analysis of Survival Data* 1984: Taylor & Francis.
114. Molinero, L. *Construcción de modelos de regresión multivariantes*. 2002.
115. Brooks, S.P. and S.B. Dunnett, *Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide*. *Nat Rev Neurosci*, 2009. **10**(7): p. 519-29.
116. Carter, R.J., J. Morton, and S.B. Dunnett, *Motor coordination and balance in rodents*. *Curr Protoc Neurosci*, 2001. **Chapter 8**: p. Unit 8 12.
117. Clark, H.B., et al., *Purkinje cell expression of a mutant allele of SCA1 in transgenic mice leads to disparate effects on motor behaviors, followed by a progressive cerebellar dysfunction and histological alterations*. *J Neurosci*, 1997. **17**(19): p. 7385-95.
118. Luong, T.N., et al., *Assessment of motor balance and coordination in mice using the balance beam*. *J Vis Exp*, 2011(49).
119. Southwell, A.L., J. Ko, and P.H. Patterson, *Intrabody gene therapy ameliorates motor, cognitive, and neuropathological symptoms in multiple mouse models of Huntington's disease*. *J Neurosci*, 2009. **29**(43): p. 13589-602.
120. Korpi, E.R., et al., *Cerebellar granule-cell-specific GABAA receptors attenuate benzodiazepine-induced ataxia: evidence from $\alpha 6$ -subunit-deficient mice*. *European Journal of Neuroscience*, 1999. **11**(1): p. 233-240.

121. Matsuura, K., et al., *Pole test is a useful method for evaluating the mouse movement disorder caused by striatal dopamine depletion*. J Neurosci Methods, 1997. **73**(1): p. 45-8.
122. Neurauter, A.A., et al., *Cell isolation and expansion using Dynabeads*. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2007. **106**: p. 41-73.
123. Castellanos, J.E., et al., *Nerve growth factor and neurotrophin-3 modulate the rabies infection of adult sensory neurons in primary cultures*. Brain Res, 2000. **871**(1): p. 120-6.
124. Dagda, R.K., et al., *Loss of PINK1 function promotes mitophagy through effects on oxidative stress and mitochondrial fission*. J Biol Chem, 2009. **284**(20): p. 13843-55.
125. Gao, W., et al., *Temporal relationship between cytochrome c release and mitochondrial swelling during UV-induced apoptosis in living HeLa cells*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 15): p. 2855-62.
126. Legha, W., et al., *stac1 and stac2 genes define discrete and distinct subsets of dorsal root ganglia neurons*. Gene Expr Patterns, 2010. **10**(7-8): p. 368-75.
127. Marmigere, F. and P. Ernfors, *Specification and connectivity of neuronal subtypes in the sensory lineage*. Nat Rev Neurosci, 2007. **8**(2): p. 114-27.
128. Kramer, I., *Molecular pathways of proprioceptive dorsal root ganglion (DRG) sensory neuron specification*, in *Faculty of Science. Departement Biozentrum*. 2005, University of Basel.
129. Holmes, F.E., et al., *Targeted disruption of the galanin gene reduces the number of sensory neurons and their regenerative capacity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(21): p. 11563-8.
130. Lemons, L.L. and R.G. Wiley, *Galanin receptor-expressing dorsal horn neurons: role in nociception*. Neuropeptides, 2011. **45**(6): p. 377-83.
131. O'Donnell, D., et al., *Expression of the novel galanin receptor subtype GALR2 in the adult rat CNS: distinct distribution from GALR1*. J Comp Neurol, 1999. **409**(3): p. 469-81.
132. Xu, X., et al., *The effects of galanin on dorsal root ganglion neurons with high glucose treatment in vitro*. Brain Res Bull, 2012. **87**(1): p. 85-93.
133. Schauwecker, P.E., *Galanin receptor 1 deletion exacerbates hippocampal neuronal loss after systemic kainate administration in mice*. PLoS One, 2010. **5**(12): p. e15657.
134. De Biase, I., et al., *Progressive GAA expansions in dorsal root ganglia of Friedreich's ataxia patients*. Ann Neurol, 2007. **61**(1): p. 55-60.
135. Clark, R.M., et al., *The GAA triplet-repeat is unstable in the context of the human FXN locus and displays age-dependent expansions in cerebellum and DRG in a transgenic mouse model*. Hum Genet, 2007. **120**(5): p. 633-40.
136. Lewin, G.R. and B.D. Carter, *Neurotrophic factors. Preface*. Handb Exp Pharmacol, 2014. **220**: p. v-vi.
137. Teichert, R.W., et al., *Functional profiling of neurons through cellular neuropharmacology*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(5): p. 1388-95.

138. Martinez-Gutierrez, M. and J.E. Castellanos, *Morphological and biochemical characterisation of sensory neurons infected in vitro with rabies virus*. Acta Neuropathol, 2007. **114**(3): p. 263-9.
139. Beirowski, B., et al., *Mechanisms of axonal spheroid formation in central nervous system Wallerian degeneration*. J Neuropathol Exp Neurol, 2010. **69**(5): p. 455-72.
140. Chang, D.T. and I.J. Reynolds, *Mitochondrial trafficking and morphology in healthy and injured neurons*. Prog Neurobiol, 2006. **80**(5): p. 241-68.
141. Falnikar, A. and P.W. Baas, *Critical roles for microtubules in axonal development and disease*. Results Probl Cell Differ, 2009. **48**: p. 47-64.
142. King, A.E., et al., *Neuron-glia interactions underlie ALS-like axonal cytoskeletal pathology*. Neurobiol Aging, 2011. **32**(3): p. 459-69.
143. Xia, C.-H., et al., *Abnormal neurofilament transport caused by targeted disruption of neuronal kinesin heavy chain KIF5A*. The Journal of Cell Biology, 2003. **161**(1): p. 55-66.
144. Medana, I.M. and M.M. Esiri, *Axonal damage: a key predictor of outcome in human CNS diseases*. Brain, 2003. **126**(Pt 3): p. 515-30.
145. Jackson, A.C., et al., *Role of oxidative stress in rabies virus infection of adult mouse dorsal root ganglion neurons*. J Virol, 2010. **84**(9): p. 4697-705.
146. Morfini, G., et al., *Axonal transport*, in *Basic Neurochemistry*, S.T. Brady, et al., Editors. 2012.
147. Shidara, Y. and P.J. Hollenbeck, *Defects in mitochondrial axonal transport and membrane potential without increased reactive oxygen species production in a Drosophila model of Friedreich ataxia*. J Neurosci, 2010. **30**(34): p. 11369-78.
148. Liu, X.A., V. Rizzo, and S.V. Puthanveetil, *Pathologies of Axonal Transport in Neurodegenerative Diseases*. Transl Neurosci, 2012. **3**(4): p. 355-372.
149. Fernyhough, P. and N.A. Calcutt, *Abnormal calcium homeostasis in peripheral neuropathies*. Cell Calcium, 2010. **47**(2): p. 130-9.
150. Pla-Martin, D., et al., *Silencing of the Charcot-Marie-Tooth disease-associated gene GDAP1 induces abnormal mitochondrial distribution and affects Ca²⁺ homeostasis by reducing store-operated Ca²⁺ entry*. Neurobiol Dis, 2013. **55**: p. 140-51.
151. Vincent, A.M., et al., *Mitochondrial biogenesis and fission in axons in cell culture and animal models of diabetic neuropathy*. Acta Neuropathol, 2010. **120**(4): p. 477-89.
152. Zhrebetskaya, E., et al., *Development of selective axonopathy in adult sensory neurons isolated from diabetic rats: role of glucose-induced oxidative stress*. Diabetes, 2009. **58**(6): p. 1356-64.
153. Massicotte, C., B.S. Jortner, and M. Ehrich, *Morphological effects of neuropathy-inducing organophosphorus compounds in primary dorsal root ganglia cell cultures*. Neurotoxicology, 2003. **24**(6): p. 787-96.

154. Morais, V.A., et al., *PINK1 loss-of-function mutations affect mitochondrial complex I activity via NdufA10 ubiquinone uncoupling*. *Science*, 2014. **344**(6180): p. 203-7.
155. Hoekstra, A.S. and J.P. Bayley, *The role of complex II in disease*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1827**(5): p. 543-51.
156. Gaignard, P., et al., *Mutations in CYC1, encoding cytochrome c1 subunit of respiratory chain complex III, cause insulin-responsive hyperglycemia*. *Am J Hum Genet*, 2013. **93**(2): p. 384-9.
157. Rotig, A., et al., *Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia*. *Nat Genet*, 1997. **17**(2): p. 215-7.
158. Calabrese, V., et al., *Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and cellular stress response in Friedreich's ataxia*. *J Neurol Sci*, 2005. **233**(1-2): p. 145-62.
159. Hayashi, G. and G. Cortopassi, *Oxidative stress in inherited mitochondrial diseases*. *Free Radic Biol Med*, 2015.
160. Barsukova, A.G., M. Forte, and D. Bourdette, *Focal Increases of Axoplasmic Ca²⁺, Aggregation of SodiumCalcium Exchanger, N-type Ca²⁺ Channel and Actin Define the Sites of Spheroids in Axons Undergoing Oxidative Stress*. *J Neurosci Methods*, 2012. **32**(35): p. 12028–12037.
161. Averaimo, S. and X. Nicol, *Intermingled cAMP, cGMP and calcium spatiotemporal dynamics in developing neuronal circuits*. *Front Cell Neurosci*, 2014. **8**: p. 376.
162. Di Benedetto, G., et al., *Mitochondrial Ca²⁺(+) uptake induces cyclic AMP generation in the matrix and modulates organelle ATP levels*. *Cell Metab*, 2013. **17**(6): p. 965-75.
163. Benoit, J.N. and M.S. Taylor, *Vascular reactivity following ischemia/reperfusion*. *Front Biosci*, 1997. **2**: p. e28-33.
164. Felbel, J., et al., *Regulation of cytosolic calcium by cAMP and cGMP in freshly isolated smooth muscle cells from bovine trachea*. *J Biol Chem*, 1988. **263**(32): p. 16764-71.
165. Maurice, D.H., et al., *Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases*. *Nat Rev Drug Discov*, 2014. **13**(4): p. 290-314.
166. Hannila, S.S. and M.T. Filbin, *The role of cyclic AMP signaling in promoting axonal regeneration after spinal cord injury*. *Exp Neurol*, 2008. **209**(2): p. 321-32.
167. Nikulina, E., et al., *The phosphodiesterase inhibitor rolipram delivered after a spinal cord lesion promotes axonal regeneration and functional recovery*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(23): p. 8786-90.
168. Wang, L., et al., *Phosphodiesterase-5 is a therapeutic target for peripheral neuropathy in diabetic mice*. *Neuroscience*, 2011. **193**: p. 399-410.
169. Zhang, R., et al., *Sildenafil (Viagra) induces neurogenesis and promotes functional recovery after stroke in rats*. *Stroke*, 2002. **33**(11): p. 2675-80.
170. Tsou, A.Y., et al., *Mortality in Friedreich ataxia*. *J Neurol Sci*, 2011. **307**(1-2): p. 46-9.

171. Mincheva-Tasheva, S., et al., *Apoptotic cell death and altered calcium homeostasis caused by frataxin depletion in dorsal root ganglia neurons can be prevented by BH4 domain of Bcl-xL protein*. Hum Mol Genet, 2014. **23**(7): p. 1829-41.
172. Palomo, G.M., et al., *Silencing of frataxin gene expression triggers p53-dependent apoptosis in human neuron-like cells*. Hum Mol Genet, 2011. **20**(14): p. 2807-22.
173. Hohn, A. and T. Grune, *Lipofuscin: formation, effects and role of macroautophagy*. Redox Biol, 2013. **1**: p. 140-4.
174. Rajawat, Y.S. and I. Bossis, *Autophagy in aging and in neurodegenerative disorders*. Hormones (Athens), 2008. **7**(1): p. 46-61.
175. Schon, Eric A. and S. Przedborski, *Mitochondria: The Next (Neurode)Generation*. Neuron, 2011. **70**(6): p. 1033-1053.
176. Wong, A., et al., *The Friedreich's ataxia mutation confers cellular sensitivity to oxidant stress which is rescued by chelators of iron and calcium and inhibitors of apoptosis*. Hum Mol Genet, 1999. **8**(3): p. 425-30.
177. Ma, M., *Role of calpains in the injury-induced dysfunction and degeneration of the mammalian axon*. Neurobiol Dis, 2013. **60**: p. 61-79.
178. Nguyen, H.T., et al., *Elevated [Ca²⁺]_i levels occur with decreased calpain activity in aged fibroblasts and their reversal by energy-rich compounds: new paradigm for Alzheimer's disease prevention*. J Alzheimers Dis, 2013. **37**(4): p. 835-48.
179. Vafai, S.B. and V.K. Mootha, *Mitochondrial disorders as windows into an ancient organelle*. Nature, 2012. **491**(7424): p. 374-383.
180. Court, F.A. and M.P. Coleman, *Mitochondria as a central sensor for axonal degenerative stimuli*. Trends in Neurosciences, 2012. **35**(6): p. 364-372.
181. Beirovski, B., *Concepts for regulation of axon integrity by enwrapping glia*. Front Cell Neurosci, 2013. **7**: p. 256.
182. Li, L., et al., *Pharmacological screening using an FXN-EGFP cellular genomic reporter assay for the therapy of Friedreich ataxia*. PLoS One, 2013. **8**(2): p. e55940.
183. Yiu, E.M., et al., *An open-label trial in Friedreich ataxia suggests clinical benefit with high-dose resveratrol, without effect on frataxin levels*. J Neurol, 2015. **262**(5): p. 1344-53.
184. Acin-Perez, R., et al., *A phosphodiesterase 2A isoform localized to mitochondria regulates respiration*. J Biol Chem, 2011. **286**(35): p. 30423-32.
185. Acin-Perez, R., et al., *Cyclic AMP produced inside mitochondria regulates oxidative phosphorylation*. Cell Metab, 2009. **9**(3): p. 265-76.
186. Gong, B., et al., *Persistent improvement in synaptic and cognitive functions in an Alzheimer mouse model after rolipram treatment*. J Clin Invest, 2004. **114**(11): p. 1624-34.

