



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
CURSO DE BIOMEDICINA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO EM BIOMEDICINA

GUSTAVO DELLA FLORA NUNES

**A Atividade Enzimática do Complexo Piruvato  
Desidrogenase em Células Mielinizantes é Essencial  
para a Manutenção Axonal**

Porto Alegre  
Dezembro de 2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
CURSO DE BIOMEDICINA

**A Atividade Enzimática do Complexo Piruvato  
Desidrogenase em Células Mielinizantes é Essencial  
para a Manutenção Axonal**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul\*, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

ORIENTADORA: Dr<sup>a</sup>. Carmem Juracy Silveira Gottfried  
CO-ORIENTADORA: Dr<sup>a</sup>. M. Laura Feltri

Porto Alegre  
Dezembro de 2013

\* Executado parcialmente no Instituto de pesquisa Hunter James Kelly, da SUNY- Universidade de Buffalo, durante período de graduação saundúiche concedido pela CAPES no Programa Ciências sem Fronteiras.

## **Agradecimentos**

Gostaria de deixar aqui meu agradecimento a todos que contribuíram para minha formação acadêmica durante o curso de Biomedicina, sejam eles professores, funcionários ou colegas de curso. Também gostaria de lembrar daqueles que me incentivaram na decisão de deixar minha cidade natal para estudar na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Sou também muito grato aos meus mentores científicos, que me acompanharam durante estes 5 anos em que realizei atividades de pesquisa. É um prazer imenso conviver com pessoas de sucesso e que produzem ciência da mais alta qualidade de maneira honesta e humilde. Em especial, gostaria de agradecer à professora Carmem Gottfried e aos alunos de seu laboratório por me acompanharem desde 2011, me passando muitos conhecimentos valiosos para meu desenvolvimento científico, mas que também transcendem para minha vida pessoal e geram fortes laços de amizade.

Agradeço sinceramente à oportunidade de realizar parte de meu TCC nos Estados Unidos, no Instituto de Pesquisa Hunter James Kelly, no âmbito do Programa Ciências sem Fronteiras. Aprendi, durante este período de um ano, o que poderia levar uma pós-graduação inteira para aprender. Os ensinamentos dos professores Laura Feltri e Laurence Wrabetz e seus alunos não serão esquecidos, e, muito menos será a chance de discutir e realizar ciência de alto nível. Agradeço especialmente ao estudante de pós-doutorado Yannick Poitelon, que me acompanhou durante a realização de todos os experimentos e foi muito importante para a concepção e estruturação do projecto, assim como na viabilização de suas etapas experimentais.

Por fim, agradeço de coração a meu pai Valdemir Ribeiro Nunes, minha mãe Cecília Della Flora Nunes e minha irmã Raquel Della Flora Nunes, assim como os outros membros de minha família. Eles foram fundamentais durante minha caminhada até aqui e mantiveram seu apoio incondicional em todas as etapas de minha formação. É fruto deles a ética, o respeito, a persistência e a perspicácia que tento implementar a cada investigação científica e em cada momento de minha vida.

*"Todo hombre puede ser, si se lo propone, escultor de su propio cerebro."*

*Santiago Ramón y Cajal*

## Sumário

<b>1. Resumo</b> .....	<b>9</b>
<b>2. Introdução</b> .....	<b>10</b>
2.1 Células mielinizantes.....	10
2.2 Síntese da mielina.....	12
2.3 Funções da glia mielinizante .....	17
2.4 Complexo Piruvato Desidrogenase .....	19
2.5 O Sistema cre-loxP .....	21
2.6 CNP.....	22
<b>3. Trabalho experimental</b> .....	<b>25</b>
I. Introduction .....	27
II. Objective .....	28
III. Methods .....	29
IV. Results.....	31
V. Conclusion .....	33
VI. Discussion .....	33
VII. References .....	36
VIII. Figures.....	39
<b>4. Conclusões e perspectivas</b> .....	<b>44</b>
<b>5. Referências</b> .....	<b>51</b>
<b>6. Anexo: Normas do Periódico Neuron Glia Biology</b> .....	<b>54</b>

## **Lista de abreviaturas em português**

AceCS – Acetil-CoA Sintetase

CNP – 2',3'-nucleotídeo-cíclico 3'-fosfodiesterase

CoA – Coenzima A

CPD – Complexo enzimático Piruvato Desidrogenase

CS – Células de Schwann

E1 – Piruvato Desidrogenase, 1<sup>o</sup> componente de CDP

E2 – Dihidrolipoamida acetiltransferase, 2<sup>o</sup> componente de CDP

E3 – Dihidrolipoamida desidrogenase, 3<sup>o</sup> componente de CDP

MCT1 – Transportador de monocarboxilatos 1

NAA – N-acetil-Aspartato

OL – Oligodendrócitos

P<sub>0</sub> – Proteína zero

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – Sistema Nervoso Periférico

## **Lista de abreviaturas em inglês**

CNP – 2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase

CNS – Central Nervous System

E1 – first component of PDC

E12.5 – Embryonic day 12.5

E9 – Embryonic day 9

FAD – Flavin Adenine Dinucleotide

IACUC – Institutional Animal Care and Use Committee

KO – Knockout

MAG – Myelin-Associated Glycoprotein

MBP – Myelin Basic Protein

MCT – MonoCarboxylate Transporters

MOG – Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein

NAD – Nicotinamide Adenine Dinucleotide

NCV – Nerve Conduction Velocity

OL – Oligodendrocytes

ON – Optic Nerve

P30 – Postnatal day 30

PCR – Polymerase Chain Reaction

PDC – Pyruvate Dehydrogenase Complex

PLP – Myelin Proteolipid Protein

PMP22 – Peripheral Myelin Protein 22

PNS – Peripheral Nervous System

SC – Schwann cells

SEM – Standard Error of the Mean

SN – Sciatic Nerve

TCA – Tricarboxylic Acid

TPP – Thiamine Pyrophosphate

## Lista de Figuras

Figura 1: Esquema mostrando a organização estrutural do SNC, dando destaque aos oligodendrócitos e astrócitos .....	10
Figura 2: Células de Schwann e alguns de seus subtipos funcionais em microscopia eletrônica. ....	11
Figura 3: Estrutura esquemática da mielina .....	12
Figura 4: Ilustração esquemática da estrutura da mielina compacta .....	15
Figura 5: Formação da mielina .....	16
Figura 6: Esquema representativo das interações celulares envolvendo o fornecimento de lactato pela glia aos neurônios .....	18
Figura 7: Complexo Piruvato Desidrogenase .....	19
Figura 8: Reação catalizada pelo CPD .....	20
Figura 9: Sítios lox P .....	21
Figura 10: Aplicações do sistema cre-loxP .....	22
Figura 11: Identificação da recombinação por PCR usando primers específicos para o gene Pdh1 .....	23
Figura 12: Western blot demonstrando a redução da quantidade de Pdh1 nos camundongos KO-condicionais .....	24
Figura 13: Micrografia eletrônica de nervo óptico de camundongos Pdh1 <sup>8</sup> f/f; CNPCre <sup>+</sup> com um mês de idade. ....	44
Figura 14: Esquema ilustrando os possíveis destinos do piruvato .....	46
Figura 15: Quantificação do lactato .....	47
Figura 16: Resultado preliminar para a avaliação do perfil energético do nervo ciático de fêmeas com 1 mês de idade .....	48



## 1. Resumo

Oligodendrócitos (OL) e Células de Schwann (CS) são historicamente descritas por seu papel na mielinização no Sistema Nervoso Central e Sistema Nervoso Periférico, respectivamente, a qual é essencial para a rápida condução do potencial de ação. Entretanto, recentes estudos também têm atribuído a estas células um papel no suporte metabólico dos neurônios, principalmente em partes distantes do corpo celular. Em especial, há evidência do fornecimento de lactado aos axônios, o qual pode ser utilizado posteriormente como fonte de energia. Buscando investigar esta interrelação metabólica, nós criamos, através da abordagem Cre-loxP, camundongos  $Pdha1^{\Delta 8}/f/f; CNPCre^+$ , os quais tiveram o éxon 8 do gene *Pdha1* deletado especificamente em células produtoras de mielina. *Pdha1* é um gene que codifica para uma subunidade do primeiro componente (E1) do complexo enzimático piruvato desidrogenase (CPD), o qual é chave na interface entre a glicólise e o ciclo de Krebs, produzindo acetil-CoA a partir de piruvato. Com esta estratégia, OL e CS tiveram a atividade do CPD suprimida, o que causa redução da geração de energia e metabólitos derivados da acetil-CoA. Surpreendentemente, não se percebe nenhum impacto direto nestas células: a mielina é normalmente formada e possui a espessura esperada, além de apresentar estrutura normal ao microscópio. Por outro lado, há evidências de alterações morfológicas nos axônios dos nervos óptico e ciático aos 7 meses: é possível identificar lesões no tecido e tumefação de alguns axônios. Testes eletrofisiológicos do nervo ciático e suas ramificações demonstram manutenção da velocidade de condução nos animais  $Pdha1^{\Delta 8}/f/f; CNPCre^+$  em comparação ao controle, mas uma amplitude reduzida, o que corrobora os achados iniciais. Por fim, os camundongos  $Pdha1^{\Delta 8}/f/f; CNPCre^+$  apresentam desempenho reduzido em cerca de 50% em dois testes motores, o *rotarod* e o *grid walking test*. Tais evidências levam a crer que o metabolismo da glia mielinizante é mais interligado com o metabolismo neuronal do que anteriormente proposto. O fato de CS e OL aparentemente não serem afetados com nossa abordagem, mas originarem efeitos nos neurônios, é um forte indício deste novo papel. Mais estudos se fazem necessários, mas os resultados preliminares são muito promissores, especialmente pela possibilidade de esta função estar envolvida na patogênese de doenças com perda axonal, tais como Alzheimer, Parkinson, autismo, esquizofrenia e esclerose múltipla.

## 2. Introdução

### 2.1. Células mielinizantes

Células de Schwann (CS) e oligodendrócitos (OL) são as células responsáveis pela síntese de mielina, uma estrutura lipoproteica multilamelar que envolve a maioria dos axônios do sistema nervoso. Os OL são exclusivos do sistema nervoso central (SNC), e interagem entre si e com astrócitos através de junções gap, formando uma complexa rede de comunicação entre células (Fig. 1). Por sua vez, as CS são específicas do sistema nervoso periférico (SNP) e podem ser agrupadas em 4 categorias funcionais: SC mielinizantes, SC não-mielinizantes, SC perisinápticas, e células satélites dos gânglios (Fig. 2).

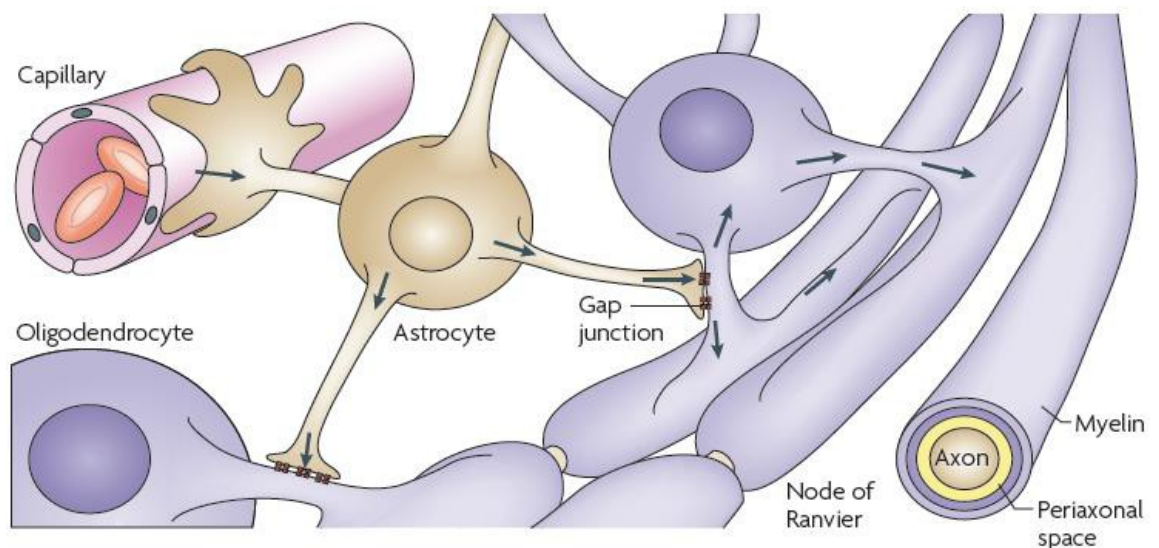


Figura 1. Esquema mostrando a organização estrutural do SNC, dando destaque aos oligodendrócitos e astrócitos [1].

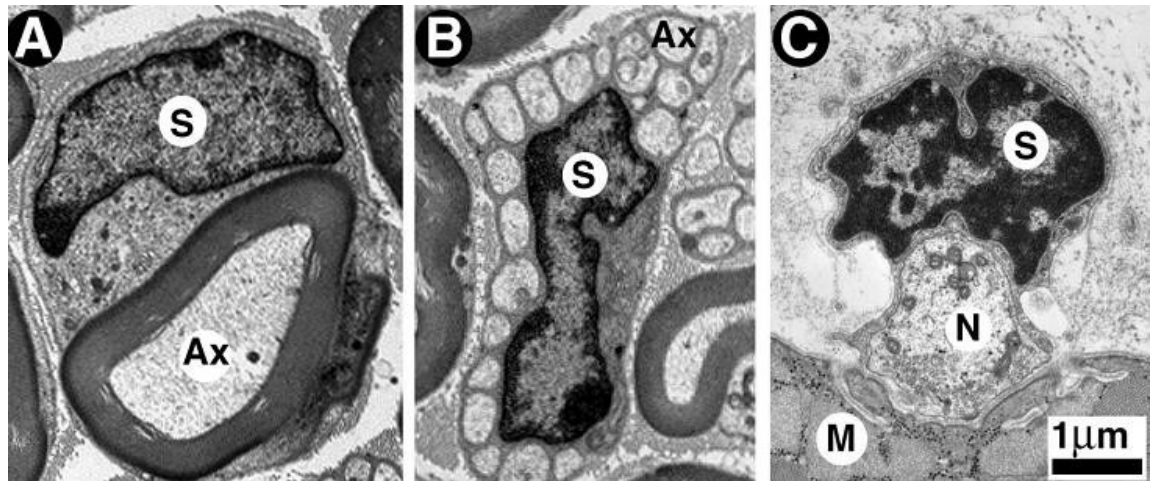


Figura 2. Células de Schwann e alguns de seus subtipos funcionais em microscopia eletrônica. Em **A** temos uma CS mielinizante. Note o núcleo marcado por S e as várias camadas de mielina cobrindo o axônio (Ax). **B** CS não-mielinizante. Uma célula circunda e engloba vários axônios (Ax), os quais não recebem camadas de mielina ao seu redor por serem pequenos (em geral menores que 1μm de diâmetro). **C** CS perisináptica ou CS terminal envolvendo a junção neuromuscular. N- neurônio. M- músculo. Alguns autores ainda classificam as células-satélites dos gânglios periféricos como um quarto subtipo. Imagem publicada na referência [2]

A mielina, seja no SNC, seja no SNP, possui uma estrutura semelhante, a qual é demonstrada na Figura 3. Basicamente, a mielina é formada em porções intermitentes do axônios, deixando regiões não-mielinizadas regularmente espaçadas em toda a sua extensão, os Nodos de Ranvier. Cada porção mielinizada por sua vez é denominada internodo. As células mielinizantes formam junções especializadas com uma região adjacente ao Nodo de Ranvier, o paranodo. Com a finalidade de facilitar o transporte de moléculas e íons para diferentes partes das células mielinizante, a mielina possui porções não-compactas. No SNP, estruturas características recebem nomes especiais: incisuras de Schmidt-Lanterman e bandas de Cajal [1]. Uma diferença notável entre a biologia de OL e CS é que cada CS forma um internodo, possuindo, portanto, uma relação 1:1 com o axônio (1 CS associa-se a somente 1 axônio; no entanto, 1 axônio necessita fazer contato com inúmeras CS para ser completamente mielinizado), enquanto cada OL pode formar cerca de 40 internodos no mesmo ou em diferentes axônios.

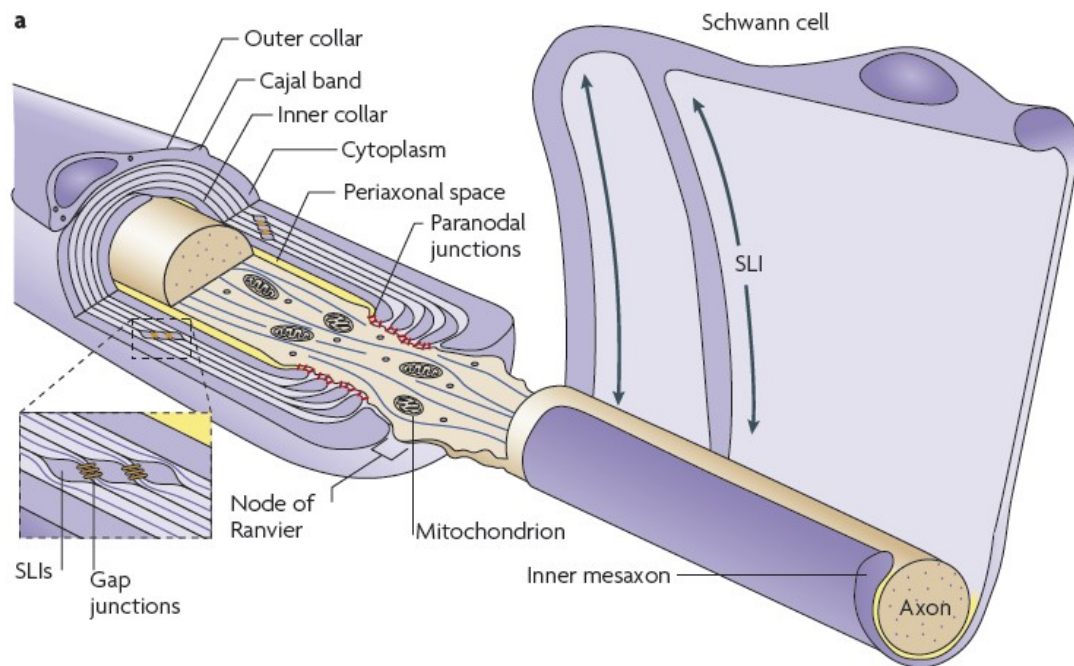


Figura 3. Estrutura esquemática da mielina [1]. Para descrição, veja texto. SLI – Incisura de Schmidt-Lanterman.

Embora a mielina formada por ambas as células tenha características comuns e seja praticamente indistinguível a nível microscópico, ela possui algumas diferenças importantes a nível de proteínas constituintes e em relação ao controle de sua síntese.

## 2.2. Síntese da mielina

No SNP, a mielinização é controlada especialmente pela proteína neuregulina 1 tipo III, expressa na membrana axonal em uma estequiometria diretamente proporcional ao diâmetro do axônio [3]. Através da interação com receptores da classe ErbB, uma cascata intracelular é ativada e a quantidade necessária de mielina é sintetizada [4]. Assim, axônios de pequeno calibre (menores que 1  $\mu\text{m}$  de diâmetro), os quais não são mielinizados, não expressam quantidades significativas de neuregulina 1 tipo III, e, nos axônios de grande calibre, quanto maior é o diâmetro axonal, maior é a expressão desta proteína e maior será a espessura da sua bainha de mielina. Outros sistemas de sinalização e comunicação neurônio-glia também auxiliam na regulação deste complexo processo. No SNP, é particularmente importante a lâmina basal produzida e secretada pelas CS, a

qual dirige a polarização das próprias CS e é essencial para seu contato com o axônio [5].

Por sua vez, a mielinização no SNC é mais complexa, e até agora, não se identificou o principal fator contribuinte para a formação da mielina. Na realidade, OL parecem possuir uma capacidade intrínseca de produzir mielina, uma vez que realizam a sua síntese ao redor de nanotubos sintéticos *in vitro* [6], além de produzirem todos os componentes da mielina em cultura primária após alguns dias de cultivo [7]. Sendo assim, os reguladores da mielinização identificados no SNC, tais como *Jagged*, *PSA-NCAM* e *LINGO-1*, são inibidores da síntese de mielina [7]. Contrariamente ao SNP, oligodendrócitos não sintetizam lâmina basal, e a polarização da célula é promovida por mecanismos ainda desconhecidos.

A mielinização é um processo extraordinário de extensão e especialização da membrana plasmática de OL e CS, na qual a área de membrana da célula é multiplicada em cerca de 6.500 x durante um único mês no caso dos roedores [8]. Isto exige mecanismos altamente coordenados de síntese proteica e de lipídeos, além de meios para o transporte dos mesmos para a mielina e precisas formas de organização. Ademais, um grande aporte de substratos é necessário neste período de intensa síntese.

Uma vez que a composição da mielina difere (quantitativamente no caso dos lipídeos e qualitativamente para as proteínas) da composição das outras membranas eucarióticas, mecanismos de síntese e transporte tiveram que se desenvolver. A mielina possui uma maior quantidade de lipídeos (>70% do peso seco), sendo enriquecida em colesterol (26% dos lipídeos), glicoesfingolipídeos (27%) e plasmalógenos\* (16%). Além disso, os glicoesfingolipídeos (representados especialmente pela galactosilceramida e pela sulfo-galactosilceramida na mielina) possuem algumas diferenças quando comparados aos glicoesfingolipídeos de outras membranas: 1. Presença de galactose em vez de glicose na cabeça polar; 2. Altos níveis de hidroxilação dos ácidos graxos; 3. Grande presença de ácidos graxos de cadeia muito longa (mais de 26 carbonos) em sua composição; e 4. Menor quantidade de insaturações nos ácidos graxos. Essas três últimas diferenças também se aplicam aos fosfolipídeos da mielina.

\* Plasmalógenos são fosfolipídeos em que a ligação do glicerol com o ácido graxo é uma função éter, e não éster, como normalmente ocorre. 13

Com relação às proteínas, são típicas da mielina (tanto no SNC quanto no SNP), MBP (do inglês *myelin basic protein*), MAG (do inglês *myelin-associated glycoprotein*) e CNP (do inglês *2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase*). Por sua vez, os principais constituintes proteicos da mielina de SNC e SNP são específicos de cada sistema. No primeiro, PLP (do inglês *Proteolipid Protein*) e sua variável de *splicing* DM20 correspondem a 50% das proteínas da mielina [9]. Já, no último, a proteína zero (P<sub>0</sub>) possui a mesma proporção. Em quantidades menores, MOG (do inglês *myelin oligodendrocyte glycoprotein*) é produzida exclusivamente por OL e PMP22 (do inglês *Peripheral myelin protein 22*) é sintetizada somente por CS [10].

Chama a atenção a grande estabilidade da mielina, como foi primorosamente demonstrado pela dissecação de um “homem do gelo” de 5.000 anos, o qual continha mielina com ultraestrutura intacta [11]. Isto se deve a um conjunto de interações não-covalentes que ocorre entre lipídeos e proteínas. Estes constituintes são, em sua maioria, hidrofóbicos, e tendem a se auto-organizar devido à repulsão pela água presente no citosol e no ambiente extracelular. Somado a isto, ocorre a formação de ligações de hidrogênio entre as hidroxilas e/ou amidas dos glicosíngolipídeos, e atração das longas cadeias carbônicas dos fosfolipídeos por forças de Van der Waals. Concomitantemente, a MBP desempenha papel essencial na compactação das membranas internas ao promover a interação de resíduos de aminoácidos básicos (presentes em grande quantidade em sua constituição) com resíduos acídicos das cabeças polares dos fosfolipídeos. Por sua vez a associação entre as membranas extracelulares é mantida especialmente pela interação homofílica de P<sub>0</sub> no SNP e PLP e outras proteínas no SNC [7] (Figura 4).

Ainda pouco é conhecido sobre como ocorre a organização de lipídeos e proteínas em camadas concêntricas ao redor do axônio. Mas duas teorias possuem a maior evidência experimental e podem ocorrer simultaneamente. A primeira delas afirma que a preparação para a mielinização começa com antecedência, com um progressivo aumento da exocitose e diminuição da endocitose na área de mielina. A outra hipótese afirma que PLP (ou P<sub>0</sub>) e lipídeos são previamente agrupados no complexo de Golgi ou retículo endoplasmático em estruturas semelhantes a rafts

lipídicos, as quais seriam transportadas pré-montadas para a mielina. Adicionalmente, outros lipídeos e proteínas poderiam ser transportados individualmente para estas mesmas regiões da membrana plasmática [5] (Figura 5). A MBP, por sua vez, é sintetizada localmente, próxima ao local de integração à membrana, e seu mRNA é que é transportado até esta região [12].

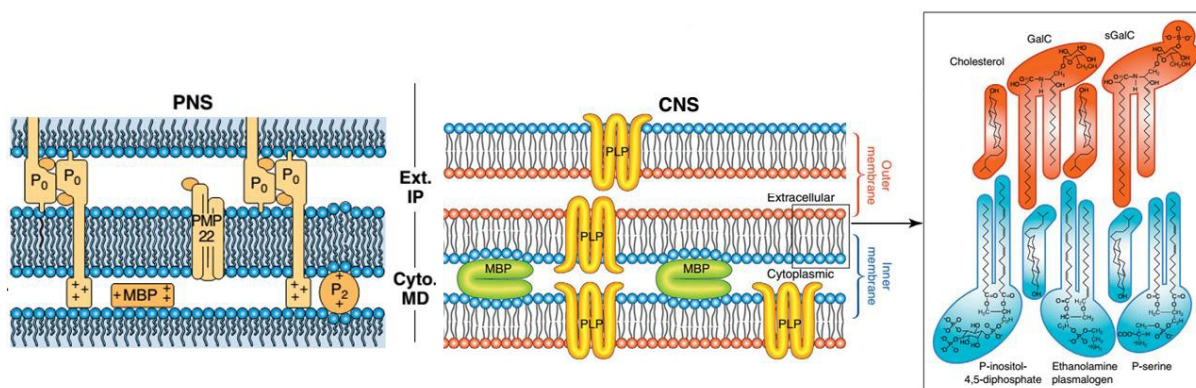


Figura 4. Ilustração esquemática da estrutura da mielina compacta. A composição lipídica e proteica é essencial para a formação e manutenção desta organização (Ver texto para descrição completa). Note que a mielina é relativamente mais compacta no SNC que no SNP. MAG, MOG, CNP e outras proteínas de menor proporção não estão representadas por provavelmente não estarem envolvidas na formação da estrutura da mielina. P<sub>2</sub> - uma variável de splicing de MBP que é típica do SNP. IP - do inglês *intraperiod line*. MD - do inglês *major dense line*. GalC - galactosilceramida. S-GalC - sulfato-galactosilceramida. Imagem modificada das referências [7] e [10].

Devido ao grande potencial anabólico de CS e OL para a biossíntese de proteínas e ácidos graxos e outros lipídeos, é de se esperar que estas células possuam um grande requerimento de substratos, sejam eles absorvidos diretamente da corrente sanguínea ou de células vizinhas. Infelizmente, os estudos ainda não são conclusivos quanto aos substratos preferenciais para síntese de macromoléculas e geração de energia na glia mielinizante. Dados experimentais *in vitro* sugerem que OL são o tipo celular do CNS mais apto à utilização da glicose [13], não sendo contudo este o melhor substrato para o metabolismo oxidativo e síntese de lipídeos [14]. Entretanto, glicose parece ser essencial para a produção de sulfato-galactosilceramida, não podendo ser substituída por lactato [15]. Corpos cetônicos parecem ser bons substratos para o fornecimento de esqueletos

carbônico para a síntese de ácidos graxos, enquanto glutamina é possivelmente importante no metabolismo energético de OL [14]. Por sua vez, lactato pode ser amplamente utilizado como fonte de energia e como precursor de lipídeos [13], e acetato, derivado principalmente do N-acetil-aspartato (NAA) pode ser utilizado eficientemente na síntese de lipídeos [16] e no metabolismo energético [17].

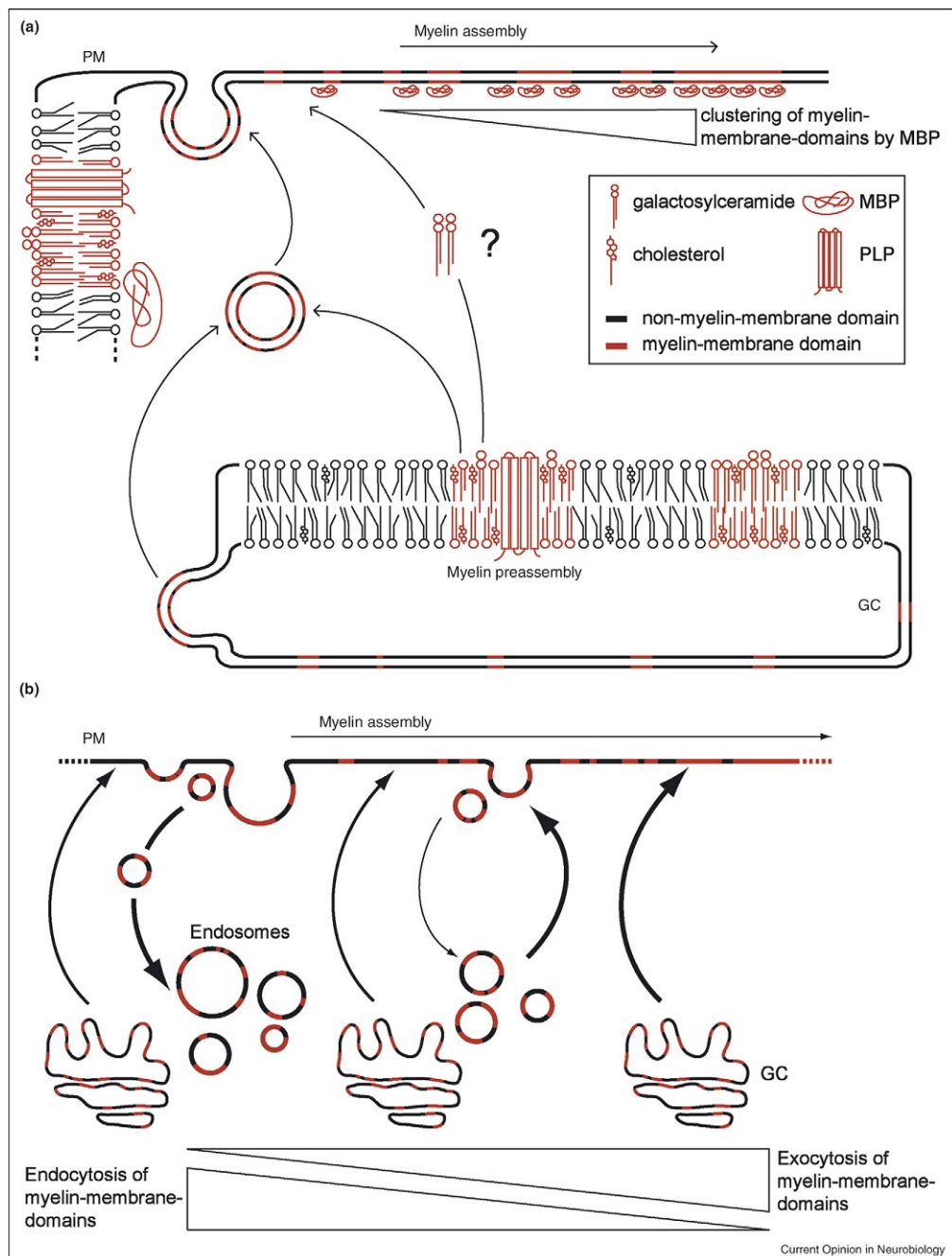


Figura 5. Formação da mielina. Duas hipóteses não mutuamente exclusivas são demonstradas. Em a) a pré-organização dos componentes, e em b) a regulação do balanço exocitose/endocitose [5]. (Ver texto para mais detalhes).



### 2.3. Funções da glia mielinizante

Uma consequência da formação da mielina é o aumento da resistência elétrica transmembrana, dificultando a passagem de íons através dela. Além do mais, células mielinizante são essenciais na mobilização dos canais de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  respectivamente para o nodo de ranvier e o justaparanodo [18]. Estas duas características promovem a condução saltatória do impulso nervoso, permitindo que a velocidade de condução aumente em até 100 vezes. A nível de comparação, um axônio não mielinizado deveria ter um diâmetro 40 x maior e utilizaria 5000 x mais energia para que a velocidade de condução fosse a mesma de um axônio mielinizado [19].

Contudo, essas não são as únicas funções de OL e CS. Recentes estudos têm demonstrado que estas células são capazes de detectar os níveis de atividade elétrica neuronal e adaptam sua função (incluindo a síntese de mielina) de acordo com as necessidades da rede [20]. Surge então um novo tipo de plasticidade, que permite a modificação de contatos neurais, fortalecendo-os ou tornando-os mais fracos [21]. De fato, alterações na espessura da mielina já foram ligadas à aprendizagem e memória [22], por exemplo durante a prática de piano [23].

E as evidências mais recentes apontam para um papel ainda mais inesperado destas células: o suporte metabólico a longos axônios. Uma vez que a própria presença da mielina limita o fluxo de metabólitos para os axônios, OL e CS poderiam ser responsáveis por fornecer nutrientes ou mesmo ATP para os axônios. Esta hipótese surgiu pela repetida observação em estudos animais de que algumas modificações genéticas em OL e CS levavam à degeneração - axonal, mas não à desmielinização. E o oposto também poderia ocorrer (ver seção 3). Por fim, em 2012, forte evidência apontou para o papel do lactato neste suporte metabólico. A interrupção genética ou farmacológica da função de MCT1 (Transportador de monocarboxilatos 1, que está presente em OL) leva à perda axonal sem nenhuma consequência detectável aos OL [24] Conclusão semelhante foi apontada no SNP, onde MCT1 é essencial para a regeneração do nervo após lesão [25].

O lactato fornecido ao neurônio poderia então ser utilizado como fonte de energia. Este lactato seria derivado ou do metabolismo glicolítico de OL

ou CS, ou de metabólitos fornecidos por células vizinhas ou pela corrente sanguínea para células mielinizante (Figura 4).

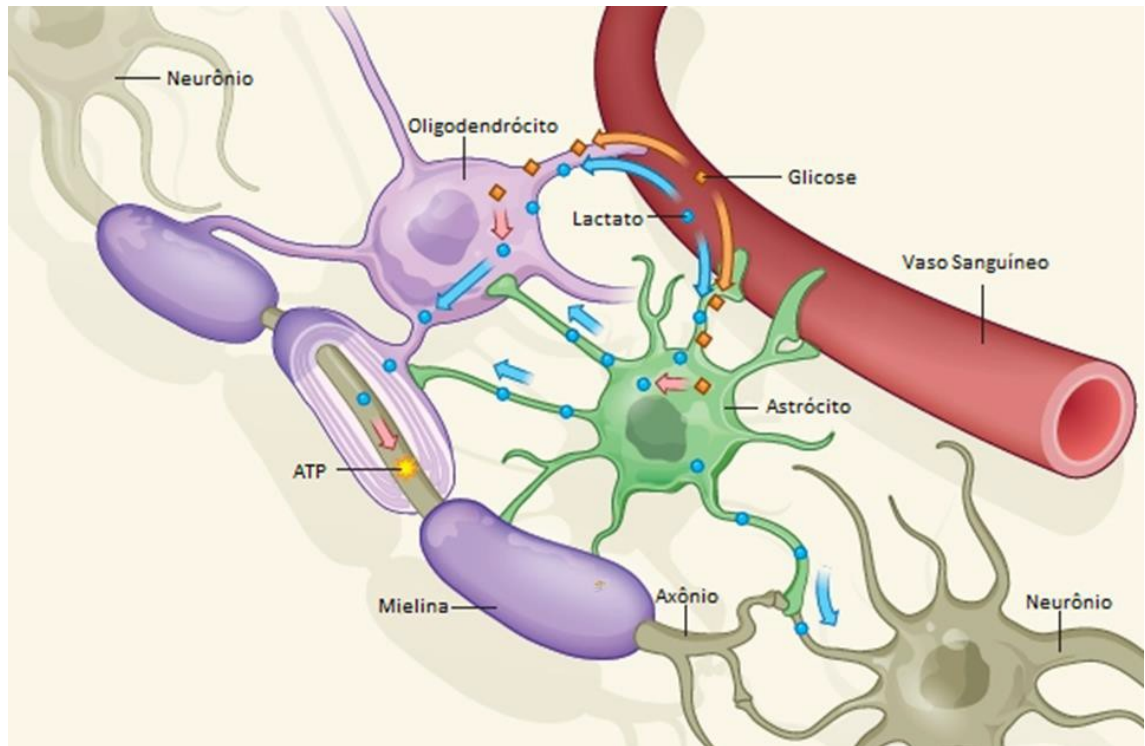


Figura 6. Esquema representativo das interações celulares envolvendo o fornecimento de lactato pela glia aos neurônios. Astrócitos são conhecidos por possuírem reservas de glicogênio em seu citoplasma, o qual pode ser utilizado para o suporte neuronal; mas o mais provável é que a molécula transmitida seja lactato e não a glicose propriamente dita. Lactato e glicose poderiam também ser captados por OL da corrente sanguínea ou de astrócitos e transportados para axônios na forma de lactato através do MCT1 em OL e MCT2 em neurônios. [26]

Entretanto não há informação se outros metabólitos também poderiam ser transferidos de OL e CS a neurônios como uma forma de manter o metabolismo dos últimos. Nós, então, estabelecemos a seguinte questão: o que aconteceria com os axônios se o metabolismo energético de células mielinizante fosse alterado de forma a ter que se basear somente na geração de energia através da glicólise? Nossa abordagem experimental foi a geração de camundongos que não possuíam atividade enzimática do complexo piruvato desidrogenase especificamente nestas células.

## 2.4. Complexo Piruvato Desidrogenase

O Complexo Piruvato Desidrogenase (CPD), é um complexo multienzimático composto por múltiplas cópias de 3 componentes catalíticos [Piruvato Desidrogenase (E1; tetrâmero  $\alpha_2\beta_2$ ), Dihidrolipoamida acetiltransferase (E2) e Dihidrolipoamida desidrogenase (E3)], um componente não catalítico (proteína de ligação a Dihidrolipoamida desidrogenase), e dois componentes regulatórios [piruvato desidrogenase quinases (4 proteínas) e Fosfo-piruvato fosfatases (2 enzimas)] [27]. Para se ter uma ideia do tamanho que o complexo atinge, o diâmetro médio em mamíferos é de 50 nm, mais de cinco vezes o tamanho de um ribossomo, e grande o suficiente para ser visto na microscopia eletrônica [28] (Fig. 5).

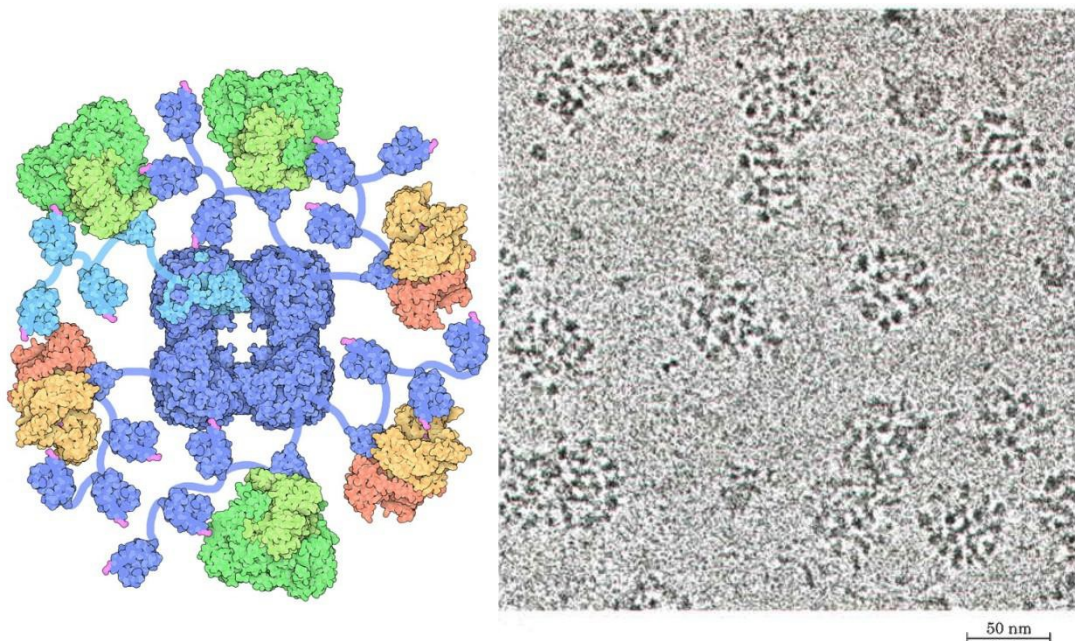


Figura 7. Complexo piruvato Desidrogenase. À esquerda, podemos ver uma representação esquemática do CPD. Verde escuro: E1. Azul escuro: E2. Laranja: E3. As demais cores representam proteínas acessórias [29]. Na imagem da direita, temos uma micrografia eletrônica de um rim de bovino, mostrando o aspecto microscópico do CPD.

CPD localiza-se na mitocôndria e cataliza a conversão de piruvato a acetil-CoA em uma complexa reação que requer cinco cofatores: pirofosfato de tiamina (TPP, do inglês thiamine pyrophosphate), dinucleotídeo de flavina-adenina (FAD, de flavin adenine dinucleotide), coenzima A (CoA), dinucleotídeo de nicotinamida-adenina (NAD, de nicotinamide adenine

dinucleotide) e lipoato. A reação enzimática é resumida na Figura 6. CPD é, por isso, uma enzima chave na ligação entre a glicólise e o Ciclo de Krebs.

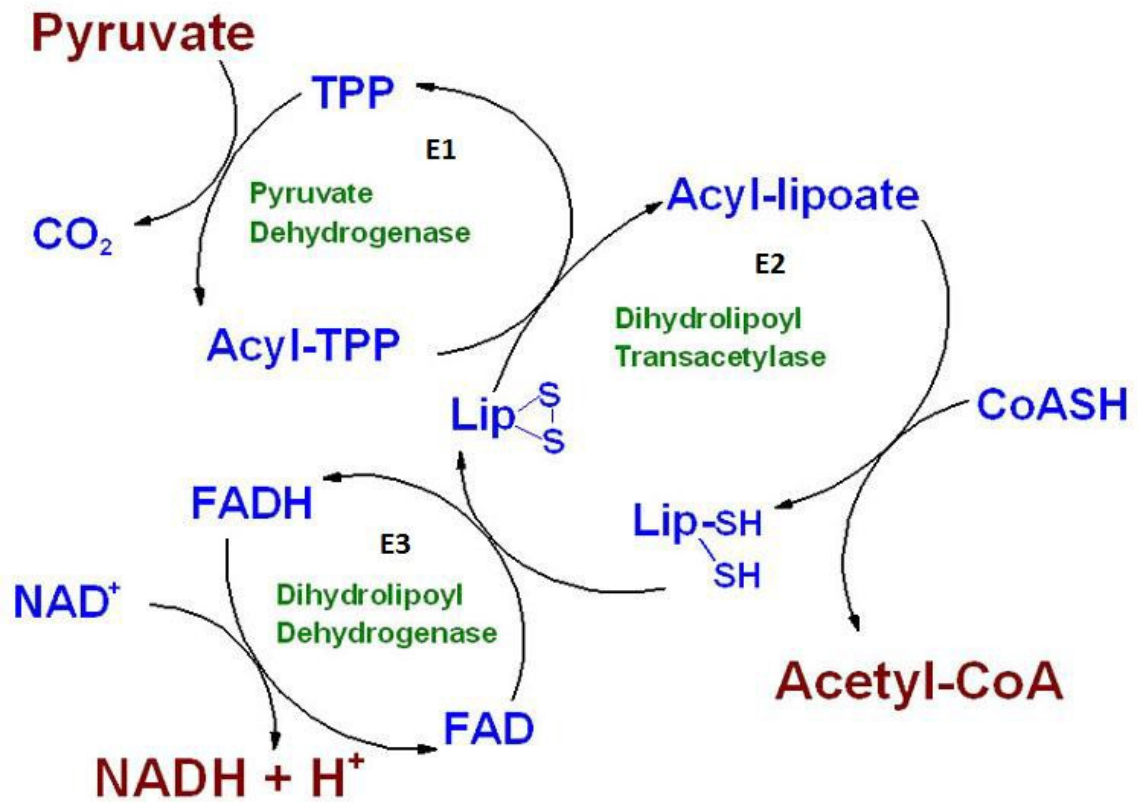


Figura 8. Reação catalizada pelo CPD. Diversas reações ocorrem em sequência (catalizadas por E1 a E3), sem que o substrato precise deixar o complexo, culminando com a geração de acetil-CoA e NADH a partir de piruvato. Modificado da referência [30]

Deficiência de CPD é uma doença hereditária causada em 90% dos casos por mutações no gene *Pdha1* (o qual codifica para a subunidade  $\alpha$  de E1), e que é caracterizada principalmente pelas manifestações neurológicas [31]. De uma maneira similar, deleção do éxon 8 do gene *Pdha1* (o que diminui a atividade enzimática de CPD em 99,99%) leva a atraso global do desenvolvimento em camundongos e claros defeitos neurais [27] [32].

Tendo como base estas informações, o primeiro objetivo de nossa pesquisa foi o uso do sistema Cre-loxP para gerar camundongos sem CPD funcional em OL e CS. Isto faria com que estas células passassem a contar exclusivamente com a energia produzida pela glicólise (2 ATPs) para a manutenção de suas atividades e das atividades de suporte a outras células,

em vez dos 32 ATPs possíveis quando a glicose é completamente oxidada pela participação do ciclo de Krebs e da fosforilação oxidativa [13].

## 2.5. O sistema Cre-loxP

O sistema Cre-loxP foi primeiramente descoberto no bacteriófago P1 e faz parte do seu ciclo viral normal [33]. Esse sistema é útil na circularização de seu DNA e na sua replicação. Como o nome sugere, este sistema possui dois componentes: a recombinase Cre, uma enzima que exerce a recombinação dos sítios loxP; e os próprios sítios loxP, que são uma sequência de 34 bp (Fig. 7). Desde então, as aplicações em biologia molecular cresceram e o sistema passou a ser amplamente utilizado para a geração de camundongos *knockout* (KO).

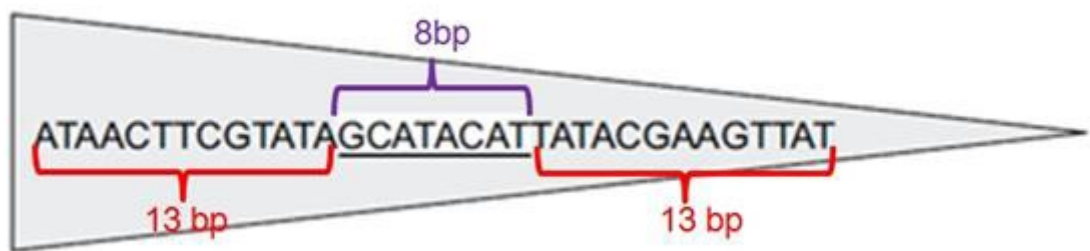


Figura 9. Sítios lox P. Eles consistem de uma sequência assimétrica de 8 bp flanqueada por duas sequências de 13 bp, sendo uma complementar a outra. Modificada da referência [34].

Como camundongos não possuem nenhum destes dois componentes, ambos devem ser inseridos por técnicas de engenharia genética. Depois disso, a recombinação é promovida pelo acasalamento de dois camundongos, um que possui os sítios loxP, e o outro que expressa a recombinase Cre. O Sistema Cre-loxP pode ser utilizado para a promoção de inversão, translocação ou deleção gênica (Fig. 8), sendo a última destacadamente a de maior aplicação atualmente.

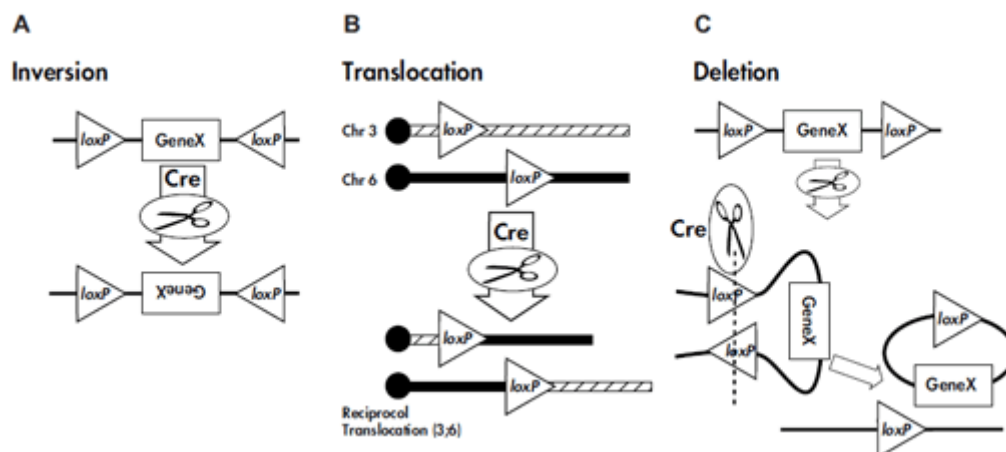


Figura 10. Aplicações do sistema cre-loxP. De acordo com a orientação do sítio loxP no genoma, podemos ter 3 diferentes tipos de recombinação gênica. A) quando os sítios loxP estão flanqueando uma região de DNA e dispostos de maneira oposta, ocorre a inversão gênica. B) se eles estão em diferentes cromossomos, ocorre a translocação. C) E em caso de sítios loxP flanqueando uma região e orientados de maneira idêntica, haverá deleção [35].

Uma vantagem adicional deste tipo de manipulação, é que o gene para a recombinase Cre pode ser produzido sobre controle de um promotor célula ou tecido-específico, possibilitando avaliação da função desempenhada por determinado gene em um grupo particular de células (o animal é referido como KO-condicional). Nós utilizamos animais em que o gene para a recombinase Cre estava sobre controle do promotor do gene 2',3'-nucleotídeo-cíclico 3'-fosfodiesterase (CNP, no inglês), que é expresso em OL e CS.

## 2.6. CNP

CNP é uma proteína amplamente expressa em células da linhagem mielinizante e é utilizada como marcador de CS e OL. Sua expressão é um dos primeiros sinais de que a célula está pronta para iniciar a mielinização dos axônios adjacentes, e continua a ocorrer nos dois possíveis destinos desta célula: a formação de mielina, ou a associação com vários axônios de pequeno calibre e a diferenciação em CS não-mielinizante. No entanto, a função de CNP ainda é obscura, e as maiores evidências apontam para um papel ligado ao ancoramento do citoesqueleto de tubulina [36].

Apesar de possuir um padrão de expressão bastante restrito, mRNA para CNP também pode ser encontrado em níveis baixos em fotorreceptores [37], células do sistema imune [38] e dos testículos [39]. Não obstante, o principal sítio de expressão será OL e CS, e por isso, este sistema é utilizado para produzir deleção gênica em células mielinizantes [36].

Sendo assim, nós produzimos camundongos  $Pdha1^{8 f/f}; CNPCre^{+}$ , os quais são KO para o éxon 8 do gene  $Pdha1$  em CS e OL. Nos tecidos onde CNP é normalmente expressa, estes animais expressarão também a recombinase Cre. É interessante notar que o gene para a recombinase Cre está presente de maneira hemizigota (ou seja, em somente uma cópia), enquanto CNP será expressa como em animais heterozigotos (também só uma cópia, uma vez que a outra cópia contém o gene para a recombinase cre em vez do gene CNP). Entretanto, a expressão de uma cópia de CNP é suficiente para manter suas funções [36]. A recombinação é comprovada por PCR (Fig. 9) e por Western blot (Fig. 10)

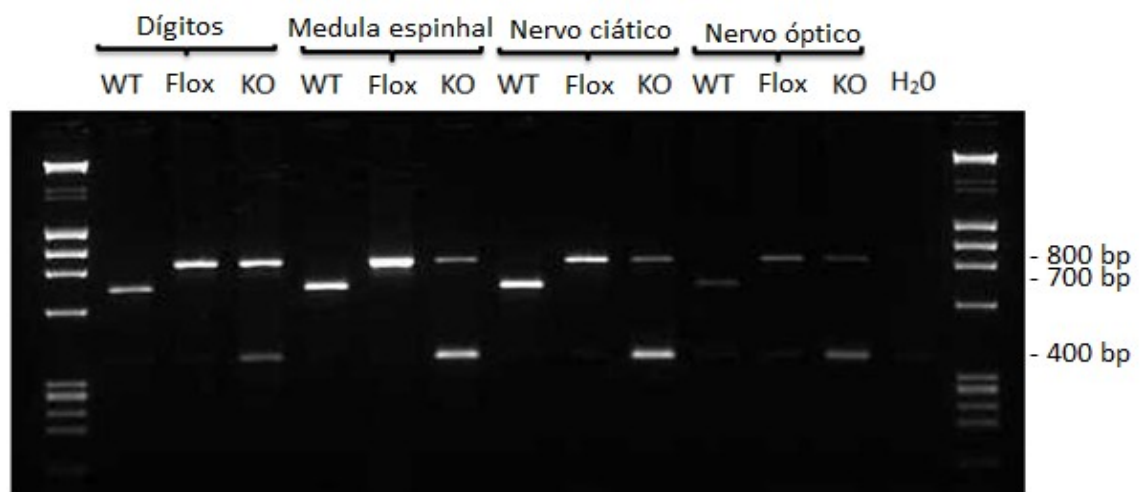


Figura 11. Identificação da recombinação por PCR usando primers específicos para o gene  $Pdha1$ . WT designa tecido de camundongos C57Bl/6 de genótipo selvagem. O fragmento de DNA gerado possui cerca de 700 bp. Por sua vez, Flox denota os camundongos que contém sítios loxP flanqueando o éxon 8 do gene  $Pdha1$ , mas sem a expressão de recombinase Cre. O fragmento de DNA gerado passa a ter aproximadamente 800 bp. KO são camundongos  $Pdha1^{8 f/f}; CNPCre^{+}$ . Pela análise de vários tecidos em que há grande presença de OL e CS (medula espinhal e nervos ciático e óptico), podemos perceber o aparecimento de uma banda de 400 bp, correspondente à deleção do éxon 8. “Toe clipping” foi utilizado para identificação dos animais, e o tecido dos dígitos assim removidos foi usado como um controle. A pequena presença de recombinação é devido às poucas CS que estão nesta região. DNA foi quantificado utilizando NanoDrop, tal que a quantidade inicial fosse igual nas amostras de um mesmo tecido.

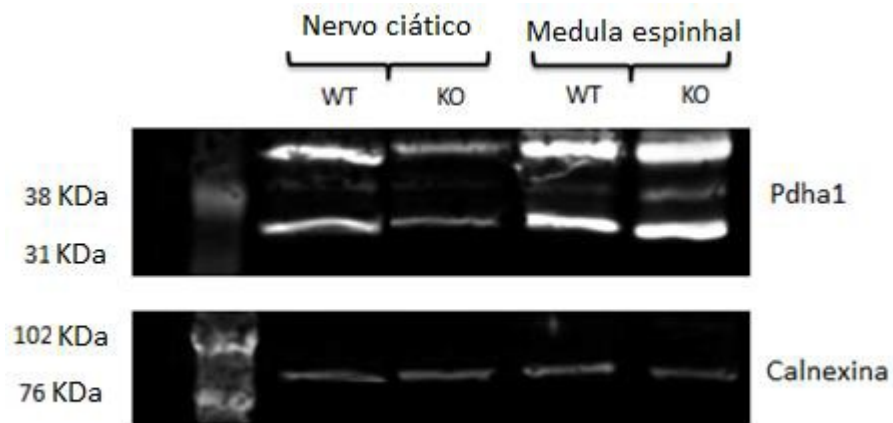


Figura 12. Western blot demonstrando a redução da quantidade de Pdha1 nos camundongos KO-condicionais. KO = Pdha1<sup>8</sup> f/f; CNPCre<sup>+</sup>. WT = camundongos de genótipo selvagem. Quantificação das bandas utilizando Image J revelou um decréscimo de 70% na quantidade de Pdha1 comparado com o WT no nervo ciático. Já na medula espinhal, nenhuma redução foi perceptível, devido à presença maciça de outras células não-modificadas, como astrócitos.



### **3. Trabalho experimental**

**(Formatado de acordo com as regras do periódico Neuron Glia Biology)**

## **The pyruvate dehydrogenase in myelinating glia is essential for long term axonal maintenance**

Gustavo Della Flora Nunes <sup>1,4\*</sup>; Yannick Poitelon <sup>1</sup>; Edward Hurley<sup>1</sup>; Mulchand Patel <sup>2</sup>; Klaus-Armin Nave <sup>3</sup>; Carmem Gottfried <sup>4</sup>, Laurence Wrabetz <sup>1</sup>; M. Laura Feltri <sup>1</sup>;

1. Hunter James Kelly Research Institute, SUNY at Buffalo, School of Medicine and Biomedical Sciences, NYS Center of Excellence in Bioinformatics & Life Sciences, Buffalo, NY 14203, USA
2. Department of Biochemistry, School of Medicine and Biomedical Sciences, University at Buffalo, Buffalo, New York
3. Department of Neurogenetics, Max Planck Institute of Experimental Medicine, Goettingen 37075, Germany
4. Department of Biochemistry, Institute of Health's Basic Science, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

### **\*CORRESPONDENCE ADDRESS:**

Gustavo Della Flora Nunes  
Departamento de Bioquímica  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Rua Ramiro Barcelos 2600 anexo  
90035 – 003 - Porto Alegre, RS - BRAZIL  
Fax: +55 51 3308 5540 Phone: +55 51 3308 5565  
E-mail: [gustavo.nunes@ufrgs.br](mailto:gustavo.nunes@ufrgs.br)

## Abstract

Oligodendrocytes and Schwann cells are well described by their role in myelination, which allows the fast conduction of action potential. However, new findings have also implicated these cells in metabolic support to axons. Aiming to study this function, we created the  $Pdha1^{\delta}$  conditional-KO mice, in which the enzymatic activity of pyruvate dehydrogenase complex was abolished specifically in myelinating glia. A comparison with the littermate controls showed that no significant difference was present in 1 month old animals in histology of sciatic nerve (SN) or motor capacity. At 7 months, the myelin remained with the same thickness in both CNS and PNS compared to controls. However, early signs of axonal loss were perceived in the semi thin sections of SN and Optic Nerve. Additionally, the performance of  $Pdha1^{\delta} f/f$ ;  $CNP-Cre^{+}$  mice in both rotarod and grid walking tests was about 50% reduced compared to control animals. A test of SN electrophysiology indicated reduced amplitude but no changes in nerve conduction velocity, what confirmed the presence of intact myelin concomitantly with axonal loss. These results shed light in the myelinating glia physiology and demonstrated that metabolic alteration in these cells can be involved in pathologic mechanisms of neurodegenerative diseases.

**Key words:** Oligodendrocyte, Schwann cells, pyruvate dehydrogenase complex, metabolic-crosstalk, neuron-glia interaction

## I. Introduction

Schwann cells (SC) and oligodendrocytes (OL) are widely known as the myelinating glial cells in Peripheral Nervous System (PNS) and Central Nervous System (CNS), respectively. They provide mechanical protection and electrical insulation to axons (Sherman and Brophy, 2005), and a great variety of pathologies arises when myelinating cells are impaired, such as multiple sclerosis (Compston and Coles, 2002), leukodystrophies and peripheral neuropathies (Nave, 2010). Also, these cells may play an important role in many other neurological disorders, including Parkinson's disease (Yazawa *et al.*, 2005), schizophrenia (Flynn *et al.*, 2003) and amyotrophic lateral sclerosis (Kang *et al.*, 2010).

Demyelinating diseases negatively impact neuronal function and lead to axonal degeneration in both CNS (Miller and Mi, 2007) and PNS (Nave *et al.*, 2007). Nonetheless, the protective actions of SC and OL seem to be independent of the myelin presence. Studies in the last decades have shown that myelin loss is not directly linked to axonal damage, since one can occur independently of the other in different animal models, such as MBP mutant mice (shiverer) (Rosenbluth, 1980), PLP-null mice (Griffiths *et al.*, 1998), Long-Evans Shaker rat (Smith *et al.*, 2013) and CNP-null mice (Lappe-Siefke *et al.*, 2003). In addition, strong evidence came from recent findings that OL and SC are also essential for neuron survival and protection of axonal extensions by mechanisms other than myelination (Viader *et al.*, 2011; Funfschilling *et al.*, 2012).

The brain metabolic requirements are impressive: it takes up 20% of the glucose in the blood and a similar amount of oxygen. And most of the generated energy is needed to keep the action potential, process that usually takes place away from the cell body and require myelinated axons (Harris and Attwell, 2012). Because the majority of proteins are synthesized in the neuronal soma, it is likely that some support to axons should derive from adjacent cells (Nave, 2010). This could be one function of SC/OL, which surround axons for all their length. Moreover, even the small caliber axons, which are devoid of myelin, need to be involved by a special type of SC to be functional (Chen *et al.*, 2003). Thus, it has been proposed that one way

myelinating glia protect neurons is to provide pyruvate/lactate to axons (Lee *et al.*, 2012), especially during glucose deprivation and CNS injury (Berthet *et al.*, 2009; Suzuki *et al.*, 2011). However, this unforeseen role of myelinating cells needs yet to be clarified.

We planned to tackle this issue by impairing the energetic metabolism of SC and OL. For this purpose, we made use of the Cre-loxP strategy to produce conditional knockout mice for the exon 8 of the *Pdha1* gene. The cell-specificity was provided by the recombinase Cre expression under control of the 2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNP) gene promoter. CNP protein is widely used as a myelinating cell marker and CNP gene is one of the earliest expressed gene in cells that will undertake myelin production (Lappe-Siefke *et al.*, 2003). *Pdha1* is an X-linked gene that codifies one subunit of the first component (E1) of pyruvate dehydrogenase complex (PDC). This enzymatic complex is a key element for the transition step between glycolysis and tricarboxylic acid (TCA) cycle, and is particularly interesting because is kept highly active by dephosphorylation in the brain (Pliss *et al.*, 2004). The E1 component catalyzes the limiting-step reaction occurring in the PDC, and the integrity of the *Pdha1* exon 8 is fundamental for its function, once deletion reduces the activity of the PDC by 99.99% in embryonic stem cells of a KO mice (Johnson *et al.*, 2001).

## **II. Objective**

In the present study, we aimed to investigate neuronal and glial alterations in the conditional-KO mice compared to their littermate controls. The myelin formation and the possible secondary changes on morphology of neurons were analyzed through light microscopy imaging of semi thin sections of sciatic nerves (SN) and optic nerves (ON). In addition, we used the rotarod and grid-walking tests to verify some functional consequences, and the nerve conduction velocity (NCV) test to analyze aspects linked to the correct function of myelin tracts.

### **III. Methods**

#### **III.a Animals**

Pdha1<sup>8</sup> f/f mice (exon 8 of the Pdha1 flanked by loxP sites) were kindly provided by Dr. Mulchand Patel (from the Biochemistry Department of University at Buffalo) (Johnson *et al.*, 2001). And mice that express the enzyme Cre recombinase under control of the CNP promoter was provided as a gift by Dr. Klaus Nave (MPG Gottingen, Germany) (Lappe-Siefke *et al.*, 2003). Both animals were from a C57BL/6 background. Pdha1<sup>8</sup> f/f mice were mated with mice hemizygous for the CNP\_Cre construct in order to generate animals hemizygous for the CNP\_Cre construct and homozygous for Pdha1<sup>8</sup> f/f. Then those animals were mated with Pdha1<sup>8</sup> f/f mice that did not have the CNP\_Cre construct. The offspring of this second matting consisted half of Pdha1<sup>8</sup> f/f; CNPCre<sup>+</sup> mice and half of Pdha1<sup>8</sup> f/f mice (that were CNPCre negative), respectively the conditional-KO and control animals. The animals were housed in the Roswell Park Cancer Institute animal facility and provided with water and food *ad libitum*. The room was kept in a 12h light-dark cycle and the temperature and humidity was controlled, as well as the presence of microorganisms in the animals' cages. We performed all the experiments with animals 1 month and 7 months old, with the exception of the NCV test, that was only analyzed in 7 months old mice.

#### **III.b Ethics statement**

The project follows in all its extension the basic ethical principles of animal research preconized by Brazil, USA and International Institutions. All the procedures were approved by the Roswell Park IACUC (Institutional Animal Care and Use Committee) and also follow the indications of the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

#### **III.c Tissue preparation**

The offspring, composed by knockout mice for Pdha1 in both SC and OL, and their littermate controls were genotyped by PCR and perfused at 1 or 7 months with Phosphate buffer followed by a paraformaldehyde (4%) solution. The mice ON and SN were dissected. Tissue samples were embedded in

epon, cut under the microtome and stained with toluidine blue. We evaluated myelin thickness of SN through a g-ratio calculation (ratio of the axon and fiber diameters) with Leica Qwin software following a previously described protocol (Colom *et al.*, 2011).

### **III.d Rotarod Test**

Rotarod test was used to assess the mouse motor capacity using the rotarod apparatus from Ugo Basile™. The animals were tested in four sections of experiments that took place during two consecutive days. On each day, one section was performed in the morning (starting at 9 AM) and another during the afternoon (starting at 3 PM). Each section consisted of 3 trials in which the rod was set to accelerate from 4RPM to 40RPM in 5 min. An observer, blind to the animal condition, monitored the test during all its extension and registered the time the animals fell from the rod or grabbed the rod and gave a complete turn on it. The upper-limit time was set as 300 sec. We computed the average performance of each animal in each test section, and averaged the results by group.

### **III.e Grid walking test**

The grid walking test was performed as described elsewhere (Chao *et al.*, 2012) with some modifications. Briefly, we used a  $41 \times 41$  cm<sup>2</sup> grid that was 41 cm high and whose grid cells were  $3.5 \times 3.5$  cm<sup>2</sup>. The mice were habituated to the apparatus a day before the experiment during 5 min of free exploration of the grid. The day after, animals were tested in 6 consecutive sections of 5 min. The 3 first were considered training, and, in the last 3, the number of total steps and the number of foot-slips were counted by a trained observer blind to the animals' genotype. A foot-slip was scored when any paw of the animal missed a rung, or when it reached successfully the rung, but slipped off during weight bearing. The experiments for all animals were conducted during morning.

### **III.f Electrophysiology**

The nerve conduction velocity (NCV) was measured by electrophysiology as previously described (Occhi *et al.*, 2005).

### **III.g Statistics**

Rotarod and grid walking test results were evaluated with Repeated Measures ANOVA. The g-ratio analysis and electrophysiology parameters were compared by Student's t-test or Mann-Whitney test when adequate. Data is reported as mean  $\pm$  SEM. All analyses were performed using the SPSS program, Version 17.0 (SPSS, Chicago, IL), and a P-value  $< 0.05$  was considered significant.

## **IV. Results**

### **IV.a Motor performance is normal in the $Pdha1^{\delta}$ f/f; CNPCre<sup>+</sup> mice at 1 month.**

At P30 (postnatal day 30),  $Pdha1^{\delta}$  f/f; CNPCre<sup>+</sup> animals and their littermate controls showed to be able to stay in the accelerating rod during the same amount of time ( $P > 0.05$ ) (Figure 1a). Moreover, they showed about the same rate of foot-slips in the grid walking test ( $P > 0.05$ ). (Figure 1b). This is consistent with the maintenance of overall locomotive capacity, since planning to execution. The results were analyzed separately by sex because the performance on those tests is known to be variable from males to females, and because the  $Pdha1$  gene is in the X chromosome. The total number of steps in the grid walking test did not differ significantly between groups (data not shown)

### **IV.b Nerve morphology is not altered in the conditional-KO animals at 1 month.**

The semithin sections of SN do not show any morphological difference compared to the littermate controls. The quantity, size and shape of the fibers are not altered (Figure 2a). The g-ratio analysis also shows that there is no

significant change in the myelin thickness, neither in the distribution of the myelin thickness by axon diameter (Figure 2b). This is indicative that PDC function is not necessary in SC during the myelination process.

#### **IV.c Motor performance is reduced in the $Pdha1^{\delta}$ f/f; CNPCre<sup>+</sup> mice at 7 months**

Contrarily to the P30 mice results, the  $Pdha1^{\delta}$  f/f; CNPCre<sup>+</sup> mice show clear motor impairment at 7 months compared to their littermate controls. The average time until fall in the rotarod is significantly reduced (Figure 3a). This result is corroborated by the increased foot-slip percentage in the grid walking test (Figure 3b). The total number of steps in the grid walking test did not differ significantly between groups (data not shown). On average, the reduction in performance is of about 50% in both tests. This could be explained either by axonal damage or myelin loss or both, what prompted us to investigate more carefully the myelinated tracts histology and function.

#### **IV.d Morphological changes occur in both CNS and PNS nerves of conditional-KO mice at 7 months**

Semithin sections of SN and ON were taken as representative of PNS and CNS respectively, and were analyzed in light microscopy. The examination revealed the presence of axonal swelling and early degeneration signs (Figure 4). None of these findings was present in the littermate controls samples. Surprisingly, the myelin seemed to be intact and of correct thickness. We then looked to confirm this visual analysis by the g-ratio technique.

#### **IV.e Myelin thickness and function is not affected in 7 months animals**

The g-ratio revealed that, as reasoned from the semithin sections observations, there is no alteration in the myelin thickness or distribution by axonal diameter in the PNS (Figure 5a). Nevertheless, it is worth to note the presence of some axonal fibers larger than 10  $\mu\text{m}$  in the  $Pdha1^{\delta}$  f/f; CNPCre<sup>+</sup> mice, what could be a result of swollen axons. A complementary evaluation of fibers functionality was conducted by electrophysiology. The velocity and amplitude of the signal being conducted in the SN and its ramifications were



recorded using electrodes. As would be expected by the intact myelin, the velocity remained the same in the conditional-KO animals compared to controls. However, a reduction in the amplitude of the signal is readily perceived, which is likely to be due to axonal loss or dysfunction.

## V. Conclusion

- PDC function is not necessary in OL and SC to myelin production, once the myelin is well formed and maintained for at least 7 months in the  $Pdha1^{\Delta f/f}; CNPCre^+$  mice and the biological rule that larger axons have thicker myelin is respected in these animals.
- Axons need some support of the myelinating cells to keep functional in aged mice, because, as our results indicate, when PDC has impaired activity in OL e SC, the axons start to degenerate.

## VI. Discussion

$Pdha1$  expression starts as early as E9 in mouse brain (Takakubo and Dahl, 1994) and CNP mRNA can be detected since E12.5 (Peyron *et al.*, 1997), which triggers *intra-utero* recombination in the  $Pdha1^{\Delta f/f}; CNPCre^+$  mice. Thus, the fact that OL e SC developed normally and myelin assembly was not affected is surprising. It implicates that myelinating cells do not need PDC activity to maintain their housekeeping functions.

The mitochondrial enzymatic complex PDC generates Acetyl-CoA from pyruvate, which can be mobilized to the TCA Cycle, following oxidative steps and culminating with energy generation through the electron transport chain (Rich, 2003). Hence, the reaction catalyzed by PDC is essential to the glucose aerobic oxidation and, accordingly, cerebral glucose oxidation is highly reduced in female mice with systemic pyruvate dehydrogenase deficiency (Pliss *et al.*, 2013). It is not known whether PDC is as active in OL and CS as in neurons. Although, in an *in vitro* study, OL was the CNS cell

type that had the higher activation of PDC after glucose addition to the cell culture (Sanchez-Abarca *et al.*, 2001). Accordingly, OL are able to fully oxidize glucose to CO<sub>2</sub> (Edmond *et al.*, 1987) and are the glial cells lineage more vulnerable to hypoxia both *in vitro* (Lyons and Kettenmann, 1998) and *in vivo* (Jelinski *et al.*, 1999). So, we likely have a huge imbalance in OL and SC of *Pdha1*<sup>8 f/f</sup>; *CNPCre*<sup>+</sup> mice. Nevertheless, the remaining energy is still sufficient to keep up with basal cells functions.

Another possible Acetyl-CoA pathway is to be directed to cytosol by the malate-aspartate shuttle through citrate transport and used as a precursor in the fatty acids synthesis, which are essential for myelin production (Verheijen *et al.*, 2009). Contradictorily, myelin is typically formed and continues to be present in the regular amount in aged conditional-KO mice. This can be due an increased support of N-acetyl-aspartate from neurons to oligodendrocytes. N-acetyl-aspartate is a metabolite produced exclusively by neurons, that reaches astonishing concentrations in the CNS (up to 10 mM), and has been proposed to be transferred to myelinating cells to further use as a source of energy and as a fatty acid precursor (Moffett *et al.*, 2007).

Unexpectedly, despite the fact myelination develops normally in *Pdha1*<sup>8 f/f</sup>; *CNPCre*<sup>+</sup> mice, there are compelling evidence that axons start to degenerate when the mice get older. The histological findings (axonal swelling, darkened axons, irregular axonal distribution and irregular shape of some axons) all point to axonal dysfunction. Additionally, the reduced performance of the conditional-KO animals at 7 months in rotarod and grid walking tests reveals impairments in motor coordination and planning, equilibrium, and fine execution of movements, functions that would depend upon correct signal conduction between neurons of both CNS and PNS. Confirming these results, the NCV is unchanged in SN branches, but amplitude is highly reduced, consistent with axonal degeneration along preservation of myelin in the remaining fibers (Mallik and Weir, 2005).

Recent publications have shown that mitochondrial dysfunction in myelinating cells leads to axonal degeneration, without necessarily affecting myelin. This is true for myelinating cells-specific disruption of *Cox10*, a component essential for assembly of cytochrome c oxidase (Funfschilling *et*

*al.*, 2012) and also for SC-specific deletion of Tfam (transcription factor A gene), a major transcription factor of mitochondrial DNA (Viader *et al.*, 2011). The main explanation of this effect was suggested to be a metabolic disconnection of myelinating glia and neurons in these animals, and lactate flow from OL e SC to axons is thought to play a central role in this metabolic support. Studies of pharmacological and genetic manipulation of subtypes of monocarboxylate transporters (MCT), the transporters of lactate in and out of the cells, confirmed lactate essential role in axonal maintenance both in CNS (Lee *et al.*, 2012) and PNS (Morrison BM, personal communication).

Here we report a lactate independent role of SC and OL in supporting axons. Our strategy did not affect the capacity of lactate production by SC and OL (data not shown). Therefore, we showed that axons are dependent of other metabolites provided by myelinating glia, or these glial cells need to metabolize products toxic to axons. In addition, this new function of OL and SC is dependent of PDC activity. We cannot rule out the possibility that non-functional Pyruvate Dehydrogenase protein is produced and exerts a new toxic function or accumulates upon degradation, leading to cell toxicity. Even tough, this is unlikely, once in a *Pdha1*<sup>8</sup> systemically deleted mice, which present a mosaic deletion in brain, cells with no expression of Pyruvate Dehydrogenase are evident in cerebral and cerebellar cortices (Pliss *et al.*, 2013).

In conclusion, PDC has to be functional in myelinating cells in order to allow axonal maintenance. This result revealed a new potential point of energetic crosstalk between neuron and glia that goes beyond lactate transport. Our data are supportive of the notion that neural and glial metabolisms are integrated, and metabolic changes in one cell-type also have non-cell-autonomous effects. Importantly, it is possible that glial metabolic dysfunctions are involved in many neurological pathologies where axons degenerate. Further studies need yet to clarify the exact mechanism by which PDC exerts its protective action in axons; however, it is imperative that evaluation of glial functions is taken in consideration when axonal degeneration is present.

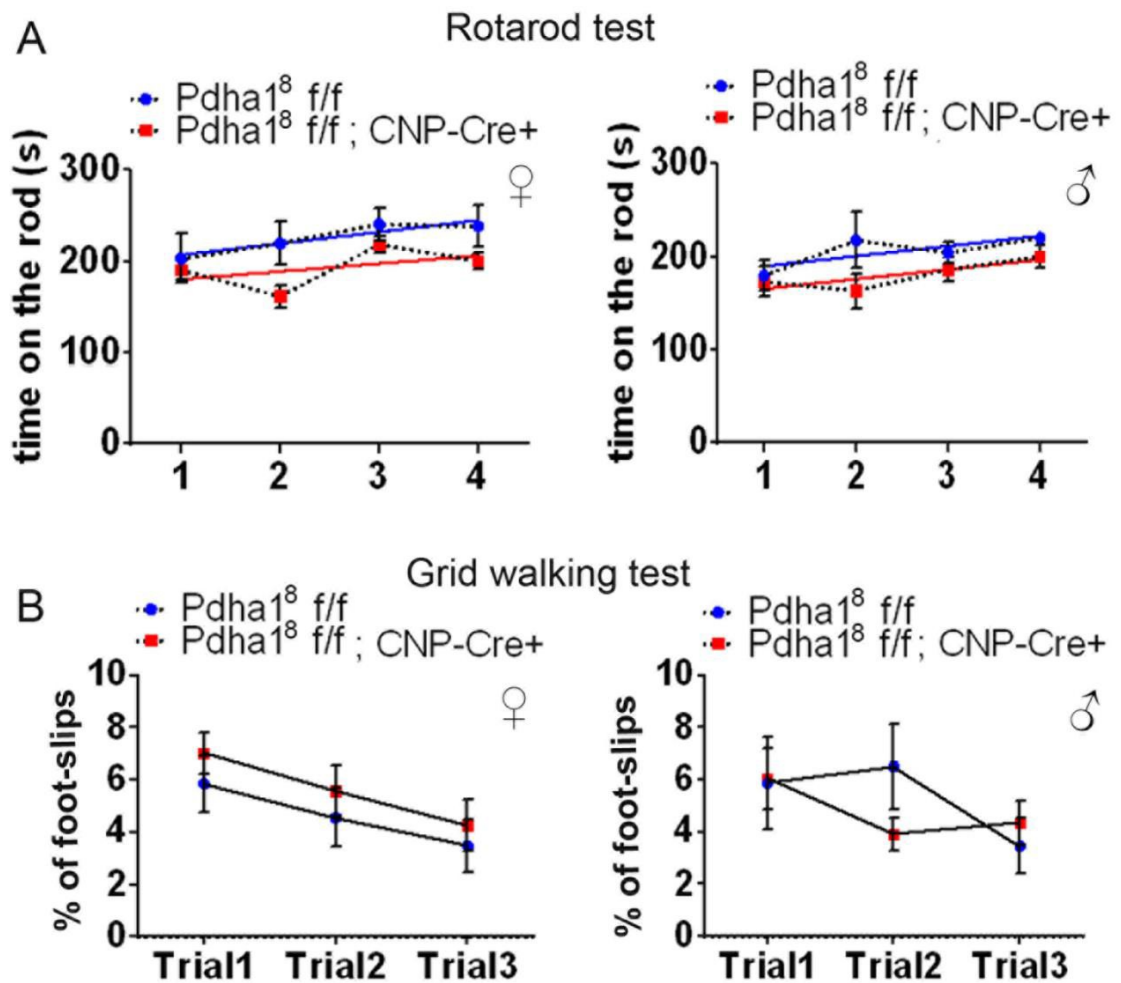
## VII. References

- Berthet, C., Lei, H., Thevenet, J., Gruetter, R., Magistretti, P. J. and Hirt, L.** (2009) Neuroprotective role of lactate after cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* **29**, 1780-1789. doi:10.1038/jcbfm.2009.97.
- Chao, O. Y., Pum, M. E., Li, J. S. and Huston, J. P.** (2012) The grid-walking test: assessment of sensorimotor deficits after moderate or severe dopamine depletion by 6-hydroxydopamine lesions in the dorsal striatum and medial forebrain bundle. *Neuroscience* **202**, 318-325. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.11.016.
- Chen, S., Rio, C., Ji, R. R., Dikkes, P., Coggeshall, R. E., Wolf, C. J. and Corfas, G.** (2003) Disruption of ErbB receptor signaling in adult non-myelinating Schwann cells causes progressive sensory loss. *Nat Neurosci* **6**, 1186-1193. doi:10.1038/nn1139.
- Colom, B., Poitelon, Y., Huang, W., Woodfin, A., Averill, S., Del Carro, U., Zambroni, D., Brain, S. D., Perretti, M., Ahluwalia, A., Priestley, J. V., Chavakis, T., Imhof, B. A., Feltri, M. L. and Nourshargh, S.** (2011) Schwann cell-specific JAM-C-deficient mice reveal novel expression and functions for JAM-C in peripheral nerves. *Faseb J.* doi:10.1096/fj.11-196220.
- Compston, A. and Coles, A.** (2002) Multiple sclerosis. *Lancet* **359**, 1221-1231. doi:10.1016/S0140-6736(02)08220-X.
- Edmond, J., Robbins, R. A., Bergstrom, J. D., Cole, R. A. and de Vellis, J.** (1987) Capacity for substrate utilization in oxidative metabolism by neurons, astrocytes, and oligodendrocytes from developing brain in primary culture. *J Neurosci Res* **18**, 551-561. doi:10.1002/jnr.490180407.
- Flynn, S. W., Lang, D. J., Mackay, A. L., Goghari, V., Vavasour, I. M., Whittall, K. P., Smith, G. N., Arango, V., Mann, J. J., Dwork, A. J., Falkai, P. and Honer, W. G.** (2003) Abnormalities of myelination in schizophrenia detected in vivo with MRI, and post-mortem with analysis of oligodendrocyte proteins. *Mol Psychiatry* **8**, 811-820. doi:10.1038/sj.mp.4001337.
- Funfschilling, U., Supplie, L. M., Mahad, D., Boretius, S., Saab, A. S., Edgar, J., Brinkmann, B. G., Kassmann, C. M., Tzvetanova, I. D., Mobius, W., Diaz, F., Meijer, D., Suter, U., Hamprecht, B., Sereda, M. W., Moraes, C. T., Frahm, J., Goebbels, S. and Nave, K. A.** (2012) Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity. *Nature* **485**, 517-521. doi:10.1038/nature11007.
- Griffiths, I., Klugmann, M., Anderson, T., Yool, D., Thomson, C., Schwab, M. H., Schneider, A., Zimmermann, F., McCulloch, M., Nadon, N. and Nave, K. A.** (1998) Axonal swellings and degeneration in mice lacking the major proteolipid of myelin. *Science* **280**, 1610-1613.
- Harris, J. J. and Attwell, D.** (2012) The energetics of CNS white matter. *J Neurosci* **32**, 356-371. doi:10.1523/JNEUROSCI.3430-11.2012.
- Jelinski, S. E., Yager, J. Y. and Juurlink, B. H.** (1999) Preferential injury of oligodendroblasts by a short hypoxic-ischemic insult. *Brain Res* **815**, 150-153.
- Johnson, M. T., Mahmood, S., Hyatt, S. L., Yang, H. S., Soloway, P. D., Hanson, R. W. and Patel, M. S.** (2001) Inactivation of the murine pyruvate dehydrogenase (Pdha1) gene and its effect on early embryonic development. *Mol Genet Metab* **74**, 293-302. doi:10.1006/mgme.2001.3249.

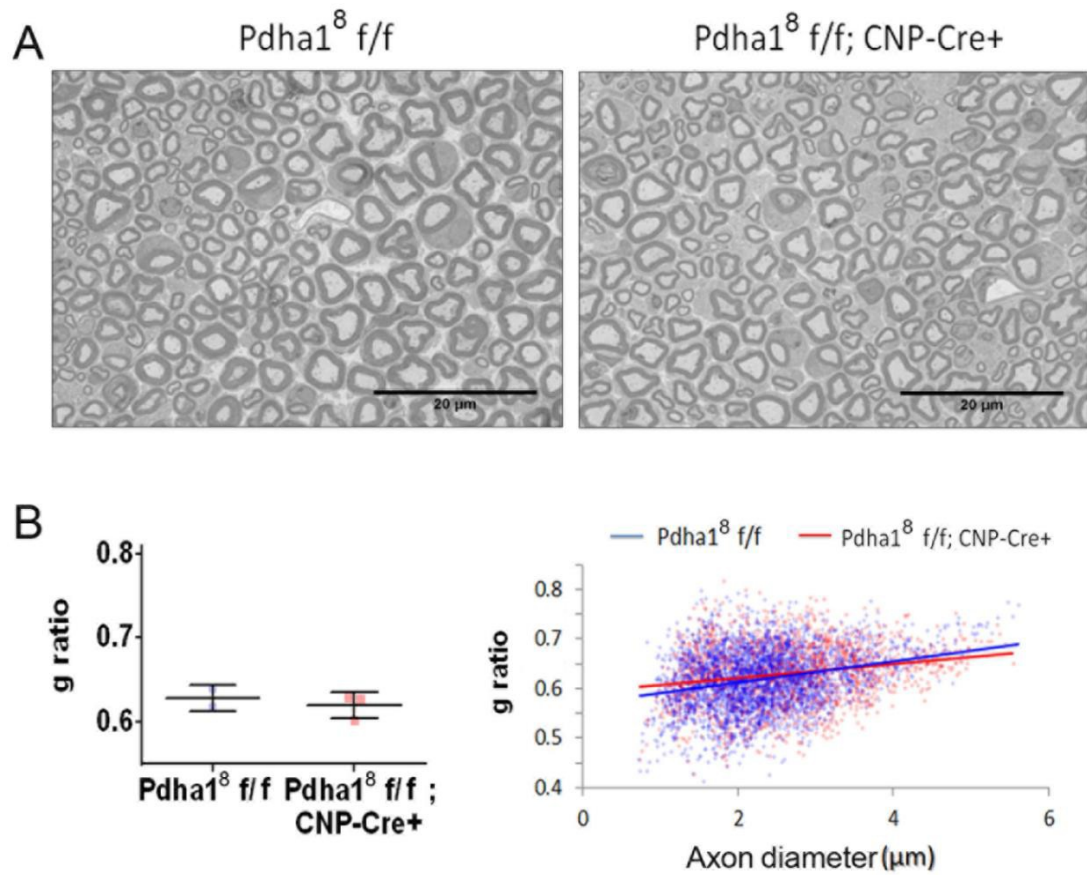
- Kang, S. H., Fukaya, M., Yang, J. K., Rothstein, J. D. and Bergles, D. E.** (2010) NG2+ CNS glial progenitors remain committed to the oligodendrocyte lineage in postnatal life and following neurodegeneration. *Neuron* **68**, 668-681. doi:10.1016/j.neuron.2010.09.009.
- Lappe-Siefke, C., Goebbels, S., Gravel, M., Nicksch, E., Lee, J., Braun, P. E., Griffiths, I. R. and Nave, K. A.** (2003) Disruption of Cnp1 uncouples oligodendroglial functions in axonal support and myelination. *Nat Genet* **33**, 366-374. doi:10.1038/ng1095.
- Lee, Y., Morrison, B. M., Li, Y., Lengacher, S., Farah, M. H., Hoffman, P. N., Liu, Y., Tsingalia, A., Jin, L., Zhang, P. W., Pellerin, L., Magistretti, P. J. and Rothstein, J. D.** (2012) Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature* **487**, 443-448. doi:10.1038/nature11314.
- Lyons, S. A. and Kettenmann, H.** (1998) Oligodendrocytes and microglia are selectively vulnerable to combined hypoxia and hypoglycemia injury in vitro. *J Cereb Blood Flow Metab* **18**, 521-530. doi:10.1097/00004647-199805000-00007.
- Mallik, A. and Weir, A. I.** (2005) Nerve conduction studies: essentials and pitfalls in practice. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **76 Suppl 2**, ii23-31. doi:10.1136/jnnp.2005.069138.
- Miller, R. H. and Mi, S.** (2007) Dissecting demyelination. *Nat Neurosci* **10**, 1351-1354. doi:10.1038/nn1995.
- Moffett, J. R., Ross, B., Arun, P., Madhavarao, C. N. and Namboodiri, A. M.** (2007) N-Acetylaspartate in the CNS: from neurodiagnostics to neurobiology. *Prog Neurobiol* **81**, 89-131. doi:10.1016/j.pneurobio.2006.12.003.
- Nave, K. A.** (2010) Myelination and support of axonal integrity by glia. *Nature* **468**, 244-252. doi:10.1038/nature09614.
- Nave, K. A., Sereda, M. W. and Ehrenreich, H.** (2007) Mechanisms of disease: inherited demyelinating neuropathies--from basic to clinical research. *Nat Clin Pract Neurol* **3**, 453-464. doi:10.1038/ncpneuro0583.
- Occhi, S., Zambroni, D., Del Carro, U., Amadio, S., Sirkowski, E. E., Scherer, S. S., Campbell, K. P., Moore, S. A., Chen, Z. L., Strickland, S., Di Muzio, A., Uncini, A., Wrabetz, L. and Feltri, M. L.** (2005) Both laminin and Schwann cell dystroglycan are necessary for proper clustering of sodium channels at nodes of Ranvier. *J Neurosci* **25**, 9418-9427. doi:10.1523/JNEUROSCI.2068-05.2005.
- Peyron, F., Timsit, S., Thomas, J. L., Kagawa, T., Ikenaka, K. and Zalc, B.** (1997) In situ expression of PLP/DM-20, MBP, and CNP during embryonic and postnatal development of the jimpy mutant and of transgenic mice overexpressing PLP. *J Neurosci Res* **50**, 190-201.
- Pliss, L., Hausknecht, K. A., Stachowiak, M. K., Dlugos, C. A., Richards, J. B. and Patel, M. S.** (2013) Cerebral Developmental Abnormalities in a Mouse with Systemic Pyruvate Dehydrogenase Deficiency. *PLoS One* **8**, e67473. doi:10.1371/journal.pone.0067473.
- Pliss, L., Pentney, R. J., Johnson, M. T. and Patel, M. S.** (2004) Biochemical and structural brain alterations in female mice with cerebral pyruvate dehydrogenase deficiency. *J Neurochem* **91**, 1082-1091. doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02790.x.

- Rich, P. R.** (2003) The molecular machinery of Keilin's respiratory chain. *Biochem Soc Trans* **31**, 1095-1105. doi:10.1042/.
- Rosenbluth, J.** (1980) Central myelin in the mouse mutant shiverer. *J Comp Neurol* **194**, 639-648. doi:10.1002/cne.901940310.
- Sanchez-Abarca, L. I., Taberero, A. and Medina, J. M.** (2001) Oligodendrocytes use lactate as a source of energy and as a precursor of lipids. *Glia* **36**, 321-329.
- Sherman, D. L. and Brophy, P. J.** (2005) Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. *Nat Rev Neurosci* **6**, 683-690. doi:10.1038/nrn1743.
- Smith, C. M., Cooksey, E. and Duncan, I. D.** (2013) Myelin loss does not lead to axonal degeneration in a long-lived model of chronic demyelination. *J Neurosci* **33**, 2718-2727. doi:10.1523/JNEUROSCI.4627-12.2013.
- Suzuki, A., Stern, S. A., Bozdagi, O., Huntley, G. W., Walker, R. H., Magistretti, P. J. and Alberini, C. M.** (2011) Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell* **144**, 810-823. doi:10.1016/j.cell.2011.02.018.
- Takakubo, F. and Dahl, H. H.** (1994) Analysis of pyruvate dehydrogenase expression in embryonic mouse brain: localization and developmental regulation. *Brain Res Dev Brain Res* **77**, 63-76.
- Verheijen, M. H., Camargo, N., Verdier, V., Nadra, K., de Preux Charles, A. S., Medard, J. J., Luoma, A., Crowther, M., Inouye, H., Shimano, H., Chen, S., Brouwers, J. F., Helms, J. B., Feltri, M. L., Wrabetz, L., Kirschner, D., Chrast, R. and Smit, A. B.** (2009) SCAP is required for timely and proper myelin membrane synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 21383-21388. doi:10.1073/pnas.0905633106.
- Viader, A., Golden, J. P., Baloh, R. H., Schmidt, R. E., Hunter, D. A. and Milbrandt, J.** (2011) Schwann cell mitochondrial metabolism supports long-term axonal survival and peripheral nerve function. *J Neurosci* **31**, 10128-10140. doi:10.1523/JNEUROSCI.0884-11.2011.
- Yazawa, I., Giasson, B. I., Sasaki, R., Zhang, B., Joyce, S., Uryu, K., Trojanowski, J. Q. and Lee, V. M.** (2005) Mouse model of multiple system atrophy alpha-synuclein expression in oligodendrocytes causes glial and neuronal degeneration. *Neuron* **45**, 847-859. doi:10.1016/j.neuron.2005.01.032.

## VIII. Figures

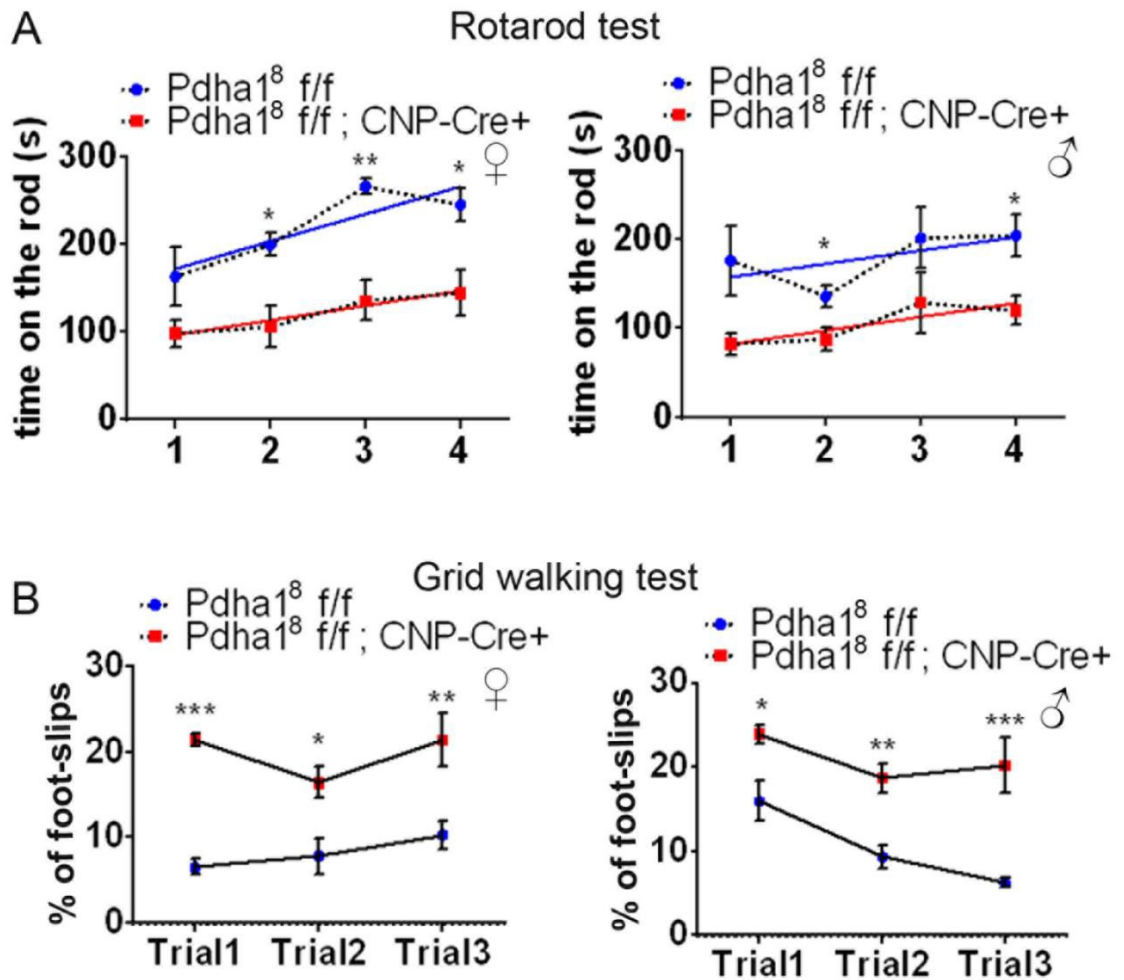


**Figure 1.** Impairment of PDC function in myelinating glia does not affect the motor capacity of mice at P30. A) Rotarod. n female: *Pdha1*<sup>8</sup> f/f = 5. *Pdha1*<sup>8</sup> f/f; CNP-Cre+ = 5. Male: *Pdha1*<sup>8</sup> f/f = 4. *Pdha1*<sup>8</sup> f/f; CNP-Cre+ = 8. B) Grid walking test. n female: *Pdha1*<sup>8</sup> f/f = 5. *Pdha1*<sup>8</sup> f/f; CNP-Cre+ = 5. Male: *Pdha1*<sup>8</sup> f/f = 4. *Pdha1*<sup>8</sup> f/f; CNP-Cre+ = 6. There is no statistically significant difference between conditional-KO mice and littermate controls in both tests.

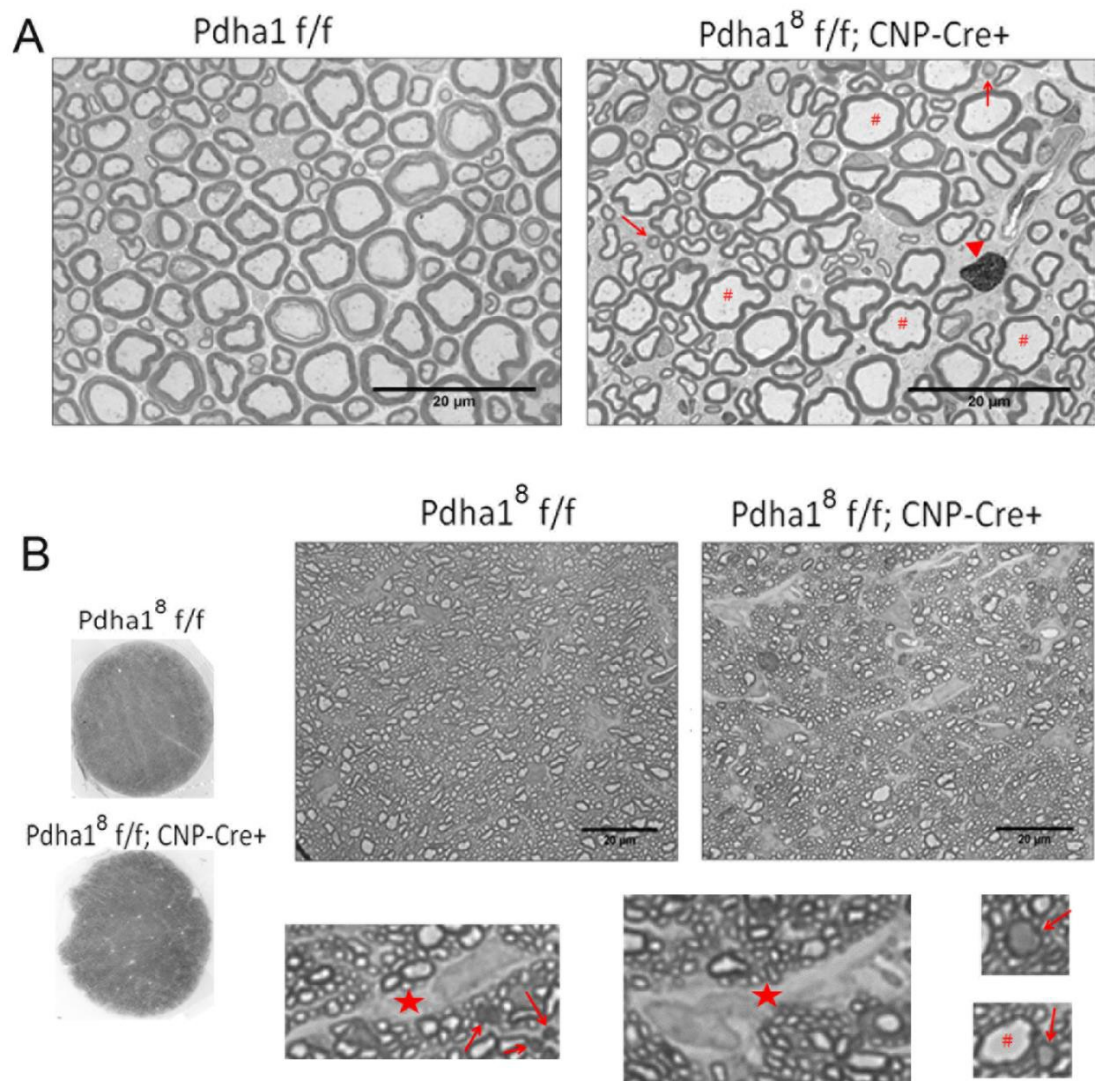


**Figure 2.** PNS nerve morphology is maintained in the  $Pdha1^{\delta} f/f; CNP-Cre+$  mice at P30. A) It's not possible to identify any structural alteration in sciatic nerves of these animals compared with controls (representative semithin sections). B) The myelin thickness is also kept near the control values indicating normal myelin formation. Left: average g-ratio value for each animal evaluated (2 controls and 3 conditional-KO, all males). Right: g-ratio values of each counted fiber distributed according the axon diameter.

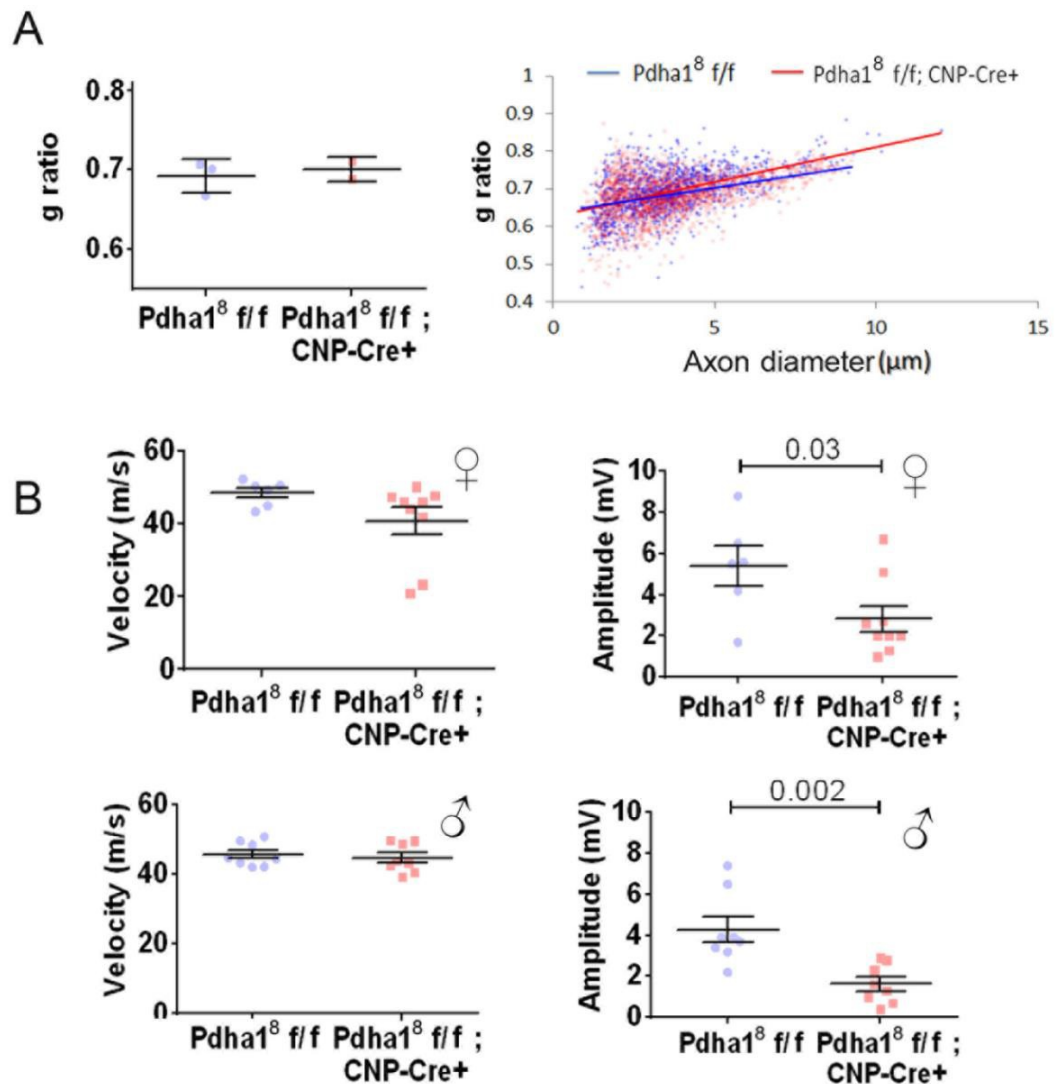




**Figure 3.** Motor function is affected in 7 months old animals lacking functional PDC in myelinating glia. A) The time in the rod is clearly reduced in the  $Pdha1^{\delta} f/f$ ;  $CNP-Cre^{+}$  mice compared with littermate controls in both sex. n female:  $Pdha1^{\delta} f/f = 3$ .  $Pdha1^{\delta} f/f$ ;  $CNP-Cre^{+} = 5$ . Male:  $Pdha1^{\delta} f/f = 4$ .  $Pdha1^{\delta} f/f$ ;  $CNP-Cre^{+} = 4$ . B)  $Pdha1^{\delta} f/f$ ;  $CNP-Cre^{+}$  mice also present a poor performance in the grid walking test. n female:  $Pdha1^{\delta} f/f = 3$ .  $Pdha1^{\delta} f/f$ ;  $CNP-Cre^{+} = 5$ . Male:  $Pdha1^{\delta} f/f = 4$ .  $Pdha1^{\delta} f/f$ ;  $CNP-Cre^{+} = 4$ . \* $p < 0.05$ . \*\* $p < 0.01$ . \*\*\* $p < 0.001$



**Figure 4.** SN and ON of Pdha1<sup>f/f</sup>; CNP-Cre+ mice show characteristics of axonal degeneration at 7 months. A) Representative images of SN of both groups. The SN of the control mice shows the expected organization: round fibers, homogeneously dispersed and with light coloration of axons. On the other hand, the conditional-KO SN shows swollen axons (number signs), darkened axons (arrows) and occasionally, the presence of immune cells (arrow head). Additionally, the fibers distribution seems to be altered, with some points lacking fibers and others with excess of small axons. B) Representative images of ON are shown in the left panel. Amplified micrographs are depicted in the top-right. Note the differences in fiber organization. Again, some of the same findings of SN are present, as well as features of gliosis/fibrous lesions (stars).



**Figure 5.** Myelin morphology and insulation capacity is not altered in the 7 months conditional-KO animals. A) Normal myelin thickness is observed in  $Pdha1^8 f/f; CNP-Cre^+$  mice through g-ratio calculation. Left: average g-ratio value for each animal evaluated (3 controls and 2 conditional-KO, all males). Right: g-ratio of each counted fiber distributed according the axon diameter. B) Confirming our histological findings, electrophysiological evaluation of sciatic nerve branches shows typical conduction speed (left panel) in both male and female mice, despite the fact that the impulse amplitude is importantly reduced (right panel). Each point represents an experimental measure. Both the right and left SN were evaluated. n female:  $Pdha1^8 f/f = 3$ .  $Pdha1^8 f/f; CNP-Cre^+ = 5$ . Male:  $Pdha1^8 f/f = 4$ .  $Pdha1^8 f/f; CNP-Cre^+ = 4$ . P-value is shown in the figure when differences are significant.

#### 4. Conclusões e Perspectivas

Analisando os dados experimentais, a primeira conclusão significativa que podemos ter é que piruvato desidrogenase não é necessária para a produção e manutenção da mielina. Esta estrutura é corretamente formada nos animais  $Pdha1^8 f/f; CNPCre^+$  e persiste pelo menos até 7 meses (como visto por histologia). Além disso, a espessura da mielina, avaliada pela g-ratio (razão entre o diâmetro axonal e o diâmetro da fibra), é consistente com os valores encontrados para os controles, e a velocidade de condução do sinal está inalterada. E mesmo a estrutura em microscopia eletrônica parece ser mantida (Fig. 11).

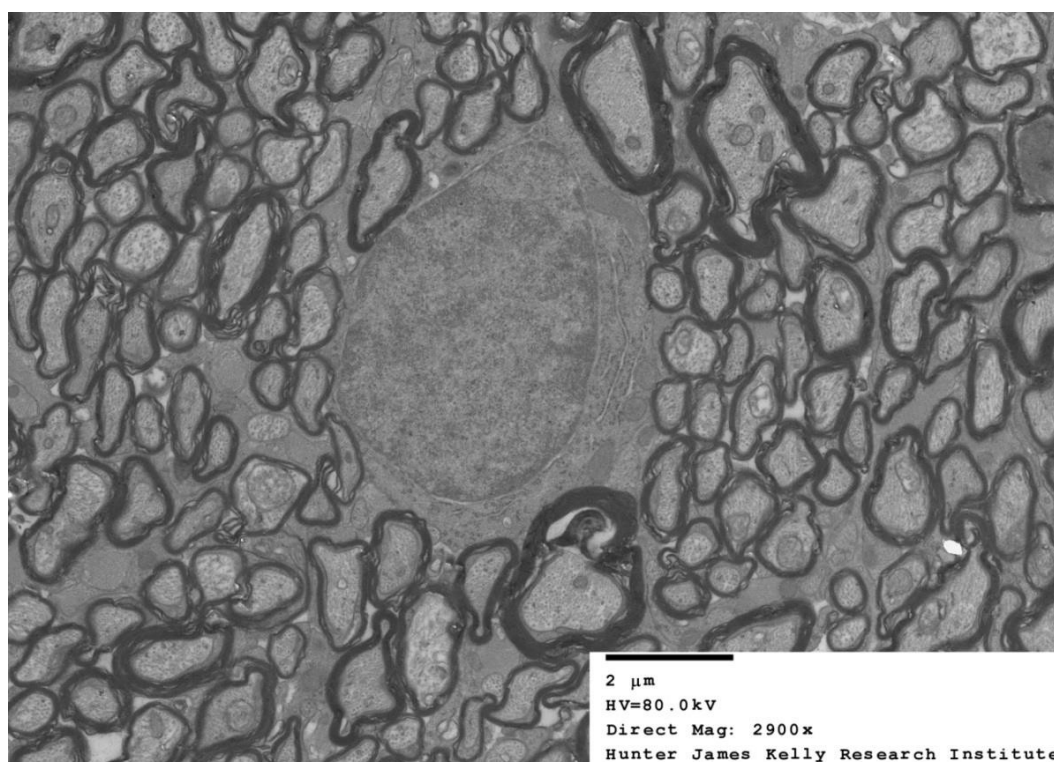


Figura 13. Micrografia eletrônica de nervo óptico de camundongos  $Pdha1^8 f/f; CNPCre^+$  com um mês de idade. No centro, um núcleo de um oligodendrócito pode ser visto. Ao redor deles estão vários axônios mielinizados. Esta e outras imagens foram analisadas por especialistas do Hunter James Kelly Research Institute, e a ultraestrutura foi considerada normal.

As hipóteses que poderiam explicar a continuação da função da mielina são muitas, e até agora nenhuma foi testada experimentalmente. A primeira delas é que neurônios poderiam fornecer N-acetil-aspartato (NAA)

para OL e CS, o qual poderia ser utilizado para a formação de acetil-CoA nestas células, estabelecendo o fluxo necessário deste metabólito para a síntese de lipídeos e para a produção de energia. Outra hipótese válida é de que a glicólise anaeróbica produz energia suficiente para manter as funções da glia mielinizadora e que outras enzimas que poderiam sintetizar acetil-CoA estariam mais ativas. A saber, estas enzimas são acetil-CoA sintetase e ATP Citrato liase. As reações catalizadas por elas estão representadas abaixo.

Acetil-CoA sintetase:



ATP Citrato liase:



Existem duas isoformas de acetil-CoA sintetase (AceCS), AceCS1, que é citoplásmica, e AceCS2, produzida na mitocôndria. Sendo assim, esta enzima teria o potencial de produzir acetil-CoA tanto para a síntese de ácidos graxos (via AceCS1), quanto para a síntese de intermediários utilizados no ciclo de Krebs (via AceCS2) [40]. Para tanto, acetato deve estar presente no devido compartimento subcelular. Este pode ser ingerido na dieta [41] ou produzido por hidrólise de acetil-CoA [42]. Seria plausível então, sugerir o deslocamento de acetato de outras vias metabólicas ou até de outras células para OL e CS a fim de promover a síntese de acetil-CoA.

ATP Citrato liase por sua vez, é uma enzima citosólica que produz acetil-CoA a partir do excesso de citrato mitocondrial (o qual é exportado para o citosol). Portanto, esta enzima é importante na síntese de acetil-CoA utilizada como precursor de lipídeos [43]. Entretanto, um de seus substratos é citrato, que é necessariamente produzido pelo ciclo de Krebs, o que torna improvável que esta via seja muito utilizada em nosso modelo, uma vez que, teoricamente, o ciclo de Krebs está menos ativo.

Outra questão importante no metabolismo energético de CS e OL dos animais  $\text{Pdha}1^{\text{f/f}}$ ;  $\text{CNPCre}^+$ , é o destino do excesso de piruvato o qual não mais passará pela ação da Piruvato desidrogenase. Duas vias chamam a atenção por já terem sido demonstradas como altamente ativas no encéfalo e especialmente nas células mielinizantes. A primeira delas é a formação de

lactato pela enzima lactato desidrogenase. Esta reação restabelece a relação NADH/NAD<sup>+</sup>, e o lactato gerado pode ser transferido para neurônios e ser utilizado como fonte de energia, como recentemente demonstrado (ver seção 2.1). A outra via é iniciada pela piruvato carboxilase, a qual cataliza a conversão de piruvato a oxaloacetato e está ativa em glia e neurônios. O oxaloacetato pode então ser convertido a malato e transferido para a mitocôndria, entrando no ciclo de Krebs. No entanto, para que o ciclo de Krebs continue, acetil-CoA será necessária posteriormente, e deverá provir de outra fonte diferente da ação do CPD [44]. A Figura 12 lista as possíveis reações que utilizam piruvato.

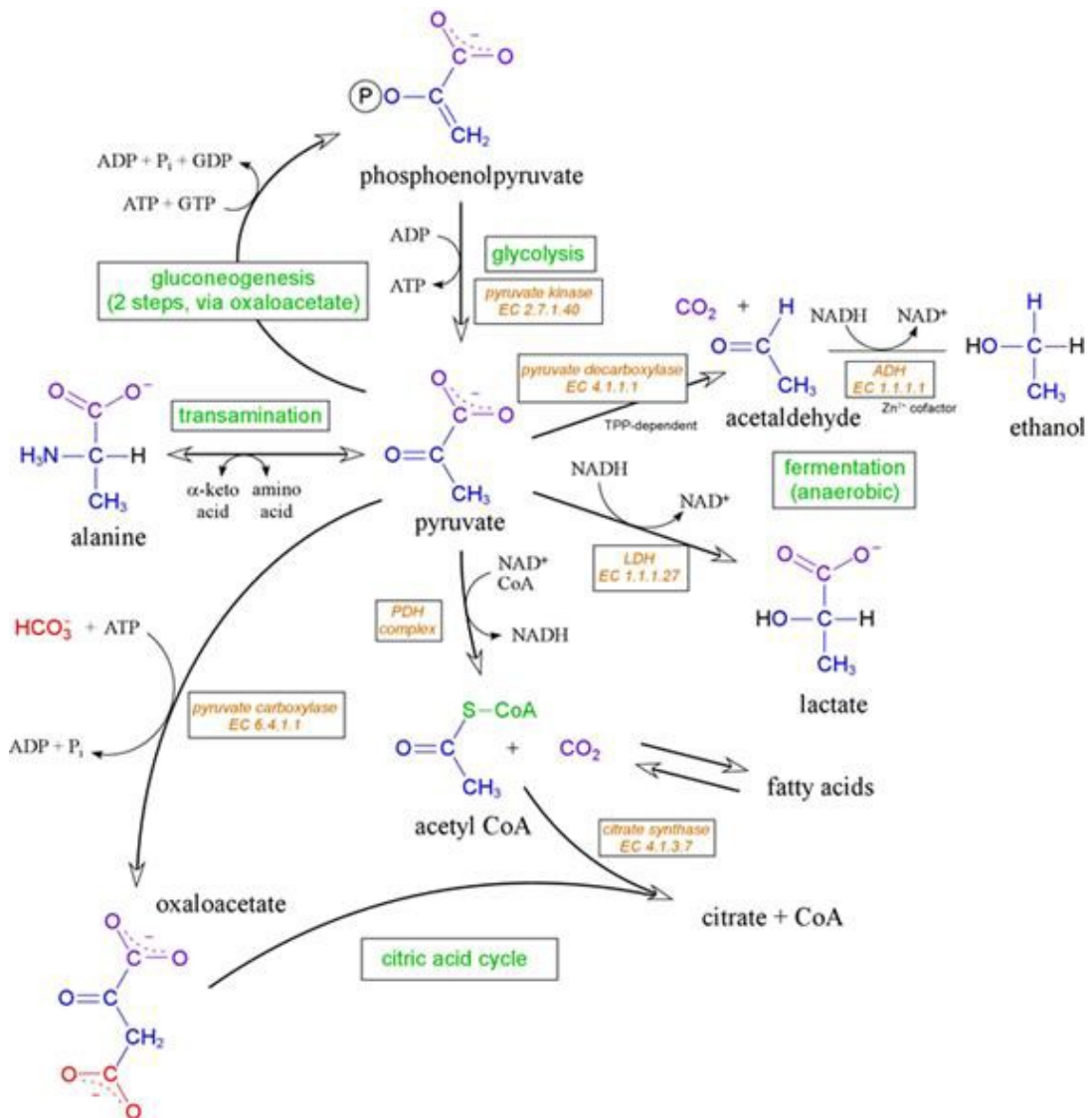


Figura 14. Esquema ilustrando os possíveis destinos do piruvato. Normalmente, a maioria do piruvato é destinada para a formação de acetil-CoA. Entretanto, nos camundongos Pdha1<sup>8 f/f</sup>; CNPCre<sup>+</sup>, uma (ou mais) via (s) diferente (s) deve utilizar o piruvato, que está em excesso. [45]

Portanto, é essencial que animais  $Pdha1^{\Delta f/f}; CNPCre^{+}$  sejam avaliados tendo como foco enzimas envolvidas nas vias metabólicas da qual piruvato e acetil-CoA participam. Além disso, é importante estudar a concentração de metabólitos chave, como lactato, ATP/ADP e acetil-CoA com a finalidade de elucidar as mudanças metabólicas que aconteceram nestes camundongos. Com relação a isso, nós já realizamos estudos preliminares das concentrações de Lactato e razão ATP/ADP (Figuras 13 e 14) e pretendemos analisar as concentrações de acetil-CoA, bem como os níveis e atividade das enzimas lactato desidrogenase, acetil-CoA sintetase e ATP Citrato liase.

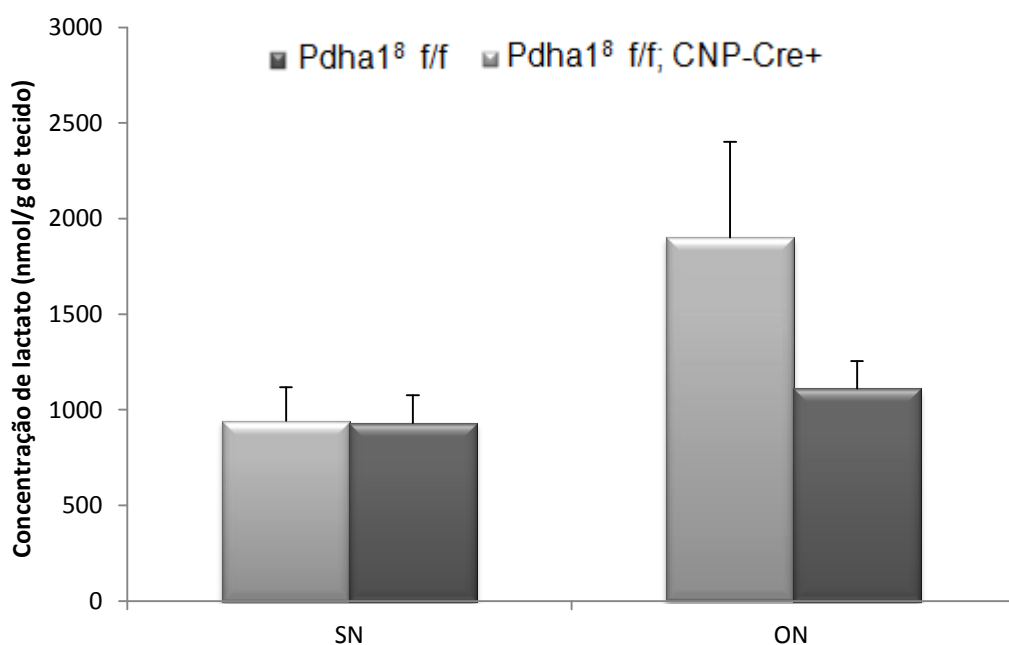


Figura 15. Quantificação do lactato. Os valores são expressos como média  $\pm$  Erro padrão e o cálculo foi feito mediante comparação com uma curva de concentração. O teste foi realizado utilizando o *Lactate assay kit (Fluorimetric, Sigma-Aldrich - MAK064)*. A concentração de lactato não é alterada no nervo ciático (SN) de camundongos KO condicionais, embora parece haver uma tendência de aumento no nervo óptico (ON). Isto indica que o lactato produzido é rapidamente metabolizado e não acumula significativamente no tecido. n SN:  $Pdha18 f/f = 3$ .  $Pdha18 f/f; CNP-Cre^{+} = 5$ . n ON:  $Pdha18 f/f = 2$ .  $Pdha18 f/f; CNP-Cre^{+} = 4$ .

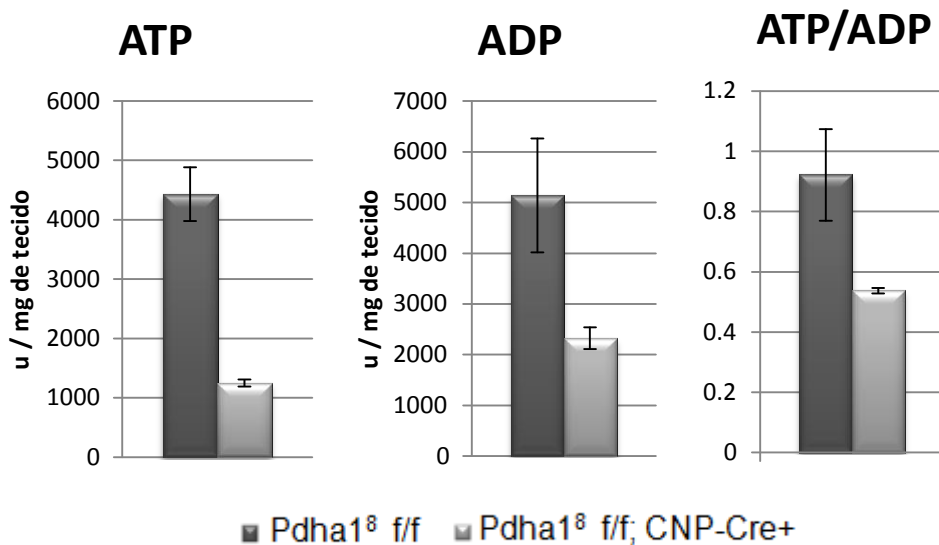


Figura 16. Resultado preliminar para a avaliação do perfil energético do nervo ciático de fêmeas com 1 mês de idade. Os valores são expressos como média  $\pm$  Erro padrão e demonstrados em unidades arbitrárias (u), sendo padronizados de acordo com o peso do tecido. O teste foi realizado utilizando o *ADP/ATP ratio assay kit* (Bioluminescence, Abcam - ab65313). Tanto ATP quanto ADP têm sua quantidade reduzida, mas a redução de ATP é mais intensa. Isto é um indicativo de que o nervo ciático dos animais KO condicionais está com o metabolismo energético avariado. n: Pdha1<sup>8</sup> f/f = 3. Pdha1<sup>8</sup> f/f; CNP-Cre+ = 2.

Uma grande dificuldade técnica destas análises é que estes estudos bioquímicos, quando realizados com tecidos de animais, irão revelar um resultado para uma grupo heterogêneo de células que estão interagindo. É muito difícil avaliar cada tipo celular individualmente e calcular a sua contribuição para o panorama geral percebido neste sistema. Apesar disto, alterações na concentração de metabólitos ou na quantidade de proteínas ou RNA percebidas no sistema são provavelmente devido a alterações das células manipuladas pela nossa proposta experimental. Por outro lado, análises *in vitro* poderiam fornecer respostas mais específicas, mas o metabolismo energético destas células provavelmente seria modificado no processo de isolamento e cultivo, além das interações metabólicas com as demais células do SNC e SNP serem totalmente perdidas. Nós planejamos utilizar diversas ferramentas *in vitro* para o estudo de neurônios, OL e CS de animais Pdha1<sup>8</sup> f/f; CNP-Cre<sup>+</sup>, desde culturas primárias destas células, até sistemas de cultura mista e mais complexos.



Isto também nos dará mais certeza sobre o KO específico de Pdha1<sup>8</sup> em OL e CS. PCR e Western blot poderão ser repetidos para estes sistemas *in vitro*. Ademais, estes sistemas poderão permitir a análise da atividade de CPD, a confirmação final de que a enzima não está funcional somente em OL e CS e não em outros tipos celulares. Nós planejamos também avaliar a atividade de CPD em nervos óptico e ciático.

A outra grande conclusão que provém de nossos resultados, é que neurônios necessitam de algum suporte de OL e CS o qual é mantido somente quando estas células gliais possuem CPD funcional. Basicamente, há duas alternativas que poderiam explicar o fenótipo presente em camundongos Pdha1<sup>8</sup> f/f; CNPCre<sup>+</sup>: a perda de função (do inglês *loss of function*), ou seja, algum metabólito deixou de ser fornecido aos axônios ou acabou acumulando pela falta da atividade de CPD; ou o ganho de função (do inglês *gain of function*), a proteína sintetizada a partir de Pdha1 pode exercer uma nova função, ou causar problemas ao ser degradada, exercendo efeitos negativos na célula. Destas duas hipóteses, a primeira é favorecida, pois um ganho de função para Pdha1 provavelmente também teria efeito em OL e CS. Nesse contexto, uma análise mais aprofundada utilizando eletroforese, imunofluorescência e ensaios de atividade enzimática é necessária para avaliar a presença de remanescentes de CPD na glia mielinizante deste animais.

Um estudo recente demonstrou que oligodendrócitos produzem exossomos, os quais são capturados por neurônios e têm seu conteúdo utilizado por estas células. Nestes exossomos, o transporte tanto de proteínas e RNAs, quanto de intermediários metabólicos é possível [46]. Surpreendentemente, os autores demonstraram que a enzima recombinase Cre poderia também ser transportada para os axônios via exossomos. Isto põe em xeque os estudos que utilizam o sistema cre-loxP para promover KO condicionais para genes em OL. Não há comprovação de que o mesmo possa ocorrer em CS, mas da mesma forma que OL, CS também produzem exossomos [47], e estes são importantes no processo de regeneração axonal [48]. Nesse sentido, faz-se necessário o estudo da presença de exossomos contendo a enzima cre recombinase em nosso modelo, ou até mesmo a investigação da presença desta enzima em axônios.

Neste momento, investigações similares às apresentadas no manuscrito que acompanha esta monografia estão sendo realizadas em animais com 10 meses de idade. Os resultados iniciais apontam para piora do fenótipo, com prejuízos motores ainda maiores e perda de peso de aproximadamente 30% devido à atrofia muscular. Também estão sendo iniciados, estudos com outros animais KO condicionais para confirmar e expandir os resultados encontrados ns camundongos  $Pdha1^{\delta} f/f; CNPCre^{+}$ . O sistema Cre-loxP será utilizado para a criação de dois outros animais que possuirão o exon 8 deletado especificamente em glia mielinizante. Um dos animais terá a expressão do gene para a recombinase Cre sobre controle do promotor do gene  $P_0$ , que é expresso exclusivamente por CS mielinizante. O outro, possuirá a expressão do gene para a recombinase Cre sobre controle do promotor de  $Olig2$ , que somente é transcrito em células da linhagem oligodendroglial. Com esta estratégia nós pretendemos confirmar os dados encontrados, além de especificar quais efeitos são devidos a ações no SNC e quais podem ser creditados ao SNP.

Em conclusão, mais estudos se fazem definitivamente necessários, mas os primeiros resultados são muito promissores, especialmente pela possibilidade de que a falta do suporte metabólico de OL e CS para neurônios esteja envolvida na patogênese de doenças com perda axonal, tais como Alzheimer, Parkinson, Huntington, autismo, esquizofrenia, esclerose múltipla e esclerose lateral amiotrófica [49], [50], [51].

## 5. Referências

1. Nave, K.A., *Myelination and the trophic support of long axons*. Nat Rev Neurosci, 2010. **11**(4): p. 275-83.
2. Corfas, G., et al., *Mechanisms and roles of axon-Schwann cell interactions*. J Neurosci, 2004. **24**(42): p. 9250-60.
3. Taveggia, C., et al., *Neuregulin-1 type III determines the ensheathment fate of axons*. Neuron, 2005. **47**(5): p. 681-94.
4. Chen, S., et al., *Neuregulin 1-erbB signaling is necessary for normal myelination and sensory function*. J Neurosci, 2006. **26**(12): p. 3079-86.
5. Simons, M. and J. Trotter, *Wrapping it up: the cell biology of myelination*. Curr Opin Neurobiol, 2007. **17**(5): p. 533-40.
6. Lee, S., et al., *A rapid and reproducible assay for modeling myelination by oligodendrocytes using engineered nanofibers*. Nat Protoc, 2013. **8**(4): p. 771-82.
7. Aggarwal, S., L. Yurlova, and M. Simons, *Central nervous system myelin: structure, synthesis and assembly*. Trends Cell Biol, 2011. **21**(10): p. 585-93.
8. Chrast, R., et al., *Lipid metabolism in myelinating glial cells: lessons from human inherited disorders and mouse models*. J Lipid Res, 2011. **52**(3): p. 419-34.
9. Gudz, T.I., et al., *Myelin proteolipid protein forms a complex with integrins and may participate in integrin receptor signaling in oligodendrocytes*. J Neurosci, 2002. **22**(17): p. 7398-407.
10. Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, et al., editors, *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 6th edition. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1999.
11. Hess, M.W., et al., *5000-year-old myelin: uniquely intact in molecular configuration and fine structure*. Curr Biol, 1998. **8**(15): p. R512-3.
12. Muller, C., et al., *Making myelin basic protein -from mRNA transport to localized translation*. Front Cell Neurosci, 2013. **7**: p. 169.
13. Sanchez-Abarca, L.I., A. Tabernero, and J.M. Medina, *Oligodendrocytes use lactate as a source of energy and as a precursor of lipids*. Glia, 2001. **36**(3): p. 321-9.
14. Sykes, J.E., M. Lopes-Cardozo, and S.G. Van Den Bergh, *Substrate utilization for energy production and lipid synthesis in oligodendrocyte-enriched cultures prepared from rat brain*. Neurochem Int, 1986. **8**(1): p. 67-75.
15. Zuppinger, K., et al., *Effect of glucose deprivation on sulfatide synthesis and oligodendrocytes in cultured brain cells of newborn mice*. Pediatr Res, 1981. **15**(4 Pt 1): p. 319-25.
16. Chakraborty, G., et al., *Intraneuronal N-acetylaspartate supplies acetyl groups for myelin lipid synthesis: evidence for myelin-associated aspartoacylase*. J Neurochem, 2001. **78**(4): p. 736-45.
17. Francis, J.S., et al., *Aspartoacylase supports oxidative energy metabolism during myelination*. J Cereb Blood Flow Metab, 2012. **32**(9): p. 1725-36.

18. Occhi, S., et al., *Both laminin and Schwann cell dystroglycan are necessary for proper clustering of sodium channels at nodes of Ranvier*. J Neurosci, 2005. **25**(41): p. 9418-27.
19. Garbay, B., et al., *Myelin synthesis in the peripheral nervous system*. Prog Neurobiol, 2000. **61**(3): p. 267-304.
20. Fields, R.D., *Oligodendrocytes changing the rules: action potentials in glia and oligodendrocytes controlling action potentials*. Neuroscientist, 2008. **14**(6): p. 540-3.
21. Hagmann, P., et al., *White matter maturation reshapes structural connectivity in the late developing human brain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(44): p. 19067-72.
22. Fields, R.D., *White matter in learning, cognition and psychiatric disorders*. Trends Neurosci, 2008. **31**(7): p. 361-70.
23. Bengtsson, S.L., et al., *Extensive piano practicing has regionally specific effects on white matter development*. Nat Neurosci, 2005. **8**(9): p. 1148-50.
24. Lee, Y., et al., *Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration*. Nature, 2012. **487**(7408): p. 443-8.
25. Morrison BM et. al., PNS meeting, 2013
26. Rinholm, J.E. and L.H. Bergersen, *Neuroscience: The wrap that feeds neurons*. Nature, 2012. **487**(7408): p. 435-6.
27. Pliss, L., et al., *Cerebral Developmental Abnormalities in a Mouse with Systemic Pyruvate Dehydrogenase Deficiency*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e67473.
28. David L., Nelson Michael M. Cox, Princípios de Bioquímica de Lehninger, 5 ed., 2011, Editora Artmed, Porto Alegre, Brasil
29. RSCB-PDB - Pyruvate Dehydrogenase Complex - Disponível em <<http://www.rcsb.org/pdb/101/motm.do?momID=153>> - Acesso em 23 nov. 2013
30. Oxidation of pyruvate - Disponível em <<http://worldofbiochemistry.blogspot.com.br/2011/08/oxidation-of-pyruvate.html>> - Acesso em 23 nov. 2013
31. DeBrosse, S.D., et al., *Spectrum of neurological and survival outcomes in pyruvate dehydrogenase complex (PDC) deficiency: lack of correlation with genotype*. Mol Genet Metab, 2012. **107**(3): p. 394-402.
32. Johnson, M.T., et al., *Inactivation of the murine pyruvate dehydrogenase (Pdha1) gene and its effect on early embryonic development*. Mol Genet Metab, 2001. **74**(3): p. 293-302.
33. Sternberg, N., D. Hamilton, and R. Hoess, *Bacteriophage P1 site-specific recombination. II. Recombination between loxP and the bacterial chromosome*. J Mol Biol, 1981. **150**(4): p. 487-507.
34. Introduction to Cre-lox technology - Disponível em <<http://cre.jax.org/introduction.html>> - Acesso em 23 nov. 2013
35. Introduction to Cre-lox technology - Disponível em <<http://cre.jax.org/introduction.html>> - Acesso em 23 nov. 2013
36. Lappe-Siefke, C., et al., *Disruption of Cnp1 uncouples oligodendroglial functions in axonal support and myelination*. Nat Genet, 2003. **33**(3): p. 366-74.

37. Giulian, D. and S. Moore, *Identification of 2':3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in the vertebrate retina*. J Biol Chem, 1980. **255**(13): p. 5993-5.
38. Sprinkle, T.J., et al., *Differential expression of 2':3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in cultured central, peripheral, and extraneural cells*. Neurochem Res, 1985. **10**(7): p. 919-31.
39. Scherer, S.S., et al., *Differential regulation of the 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase gene during oligodendrocyte development*. Neuron, 1994. **12**(6): p. 1363-75.
40. Hallows, W.C., S. Lee, and J.M. Denu, *Sirtuins deacetylate and activate mammalian acetyl-CoA synthetases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(27): p. 10230-5.
41. Soliman, M.L., et al., *Acetate supplementation modulates brain histone acetylation and decreases interleukin-1beta expression in a rat model of neuroinflammation*. J Neuroinflammation, 2012. **9**: p. 51.
42. Yamashita, H., et al., *Acetate generation in rat liver mitochondria; acetyl-CoA hydrolase activity is demonstrated by 3-ketoacyl-CoA thiolase*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1761**(1): p. 17-23.
43. Bauer, D.E., et al., *ATP citrate lyase is an important component of cell growth and transformation*. Oncogene, 2005. **24**(41): p. 6314-22.
44. Hassel, B., *Pyruvate carboxylation in neurons*. J Neurosci Res, 2001. **66**(5): p. 755-62.
45. Biochemistry dictionary: Pyruvate. Disponível em <<http://guweb2.gonzaga.edu/faculty/cronk/biochem/P-index.cfm?definition=pyruvate>> . Acesso em 27 nov. 2013
46. Fruhbeis, C., et al., *Neurotransmitter-triggered transfer of exosomes mediates oligodendrocyte-neuron communication*. PLoS Biol, 2013. **11**(7): p. e1001604.
47. Lopez-Verrilli, M.A. and F.A. Court, *Transfer of vesicles from schwann cells to axons: a novel mechanism of communication in the peripheral nervous system*. Front Physiol, 2012. **3**: p. 205.
48. Lopez-Verrilli, M.A., F. Picou, and F.A. Court, *Schwann cell-derived exosomes enhance axonal regeneration in the peripheral nervous system*. Glia, 2013. **61**(11): p. 1795-806.
49. Morrison, B.M., Y. Lee, and J.D. Rothstein, *Oligodendroglia: metabolic supporters of axons*. Trends Cell Biol, 2013. **23**(12): p. 644-51.
50. Zambonin, J.L., et al., *Increased mitochondrial content in remyelinated axons: implications for multiple sclerosis*. Brain, 2011. **134**(Pt 7): p. 1901-13.
51. Kang, S.H., et al., *Degeneration and impaired regeneration of gray matter oligodendrocytes in amyotrophic lateral sclerosis*. Nat Neurosci, 2013. **16**(5): p. 571-9.

## 6. Anexo: Normas do Periódico Neuron Glia Biology

### Neuron Glia Biology

#### AIMS AND SCOPE

Neuron Glia Biology publishes high-quality original research articles reporting significant findings in the field of neuron–glia interactions, but reviews and concise summaries of relevant research are welcome. The scope of interest encompasses studies on cell–cell communication between cells in the brain and peripheral nervous system, including glial–glial, neuron–neuron, neuro–glia vascular or immune system interactions. Studies of cellular or molecular mechanisms of cell–cell communication during development, information processing, and disease, via diffusible messenger molecules, growth factors and cytokines, membrane receptors, channels and transporters, cell adhesion and extracellular matrix molecules are of interest. Methodological approaches including ultrastructure, live cell imaging, electrophysiology, biochemistry, molecular biology, transplantation, to investigate such biological processes as synaptogenesis, synaptic plasticity, nervous system development, morphogenesis, process outgrowth and regeneration, information processing, myelination, and activity-dependent communication between neurons and non-neuronal cells are appropriate. Research studies with medical implications are welcome, provided they are based on new findings in basic science. Issues are printed on a bimonthly interval, and individual papers are published continuously on-line ahead of print. There are no figure or page charges.

#### ORIGINALITY AND COPYRIGHT

To be considered for publication in Neuron Glia Biology a manuscript cannot have been published previously, nor can it be under review for publication elsewhere. Papers with multiple authors are reviewed with the assumption that all authors have approved the submitted manuscript and concur in its submission to Neuron Glia Biology. A Transfer of Copyright Agreement must be executed before an article can be published. Government authors whose articles were created in the course of their employment must so certify in lieu of copyright transfer. Authors are responsible for obtaining written permission from the copyright owners to reprint any previously published material included in their article.

## MANUSCRIPT SUBMISSION AND REVIEW

Neuron Glia Biology accepts electronic submission of manuscripts, allowing authors to benefit from faster review and earlier, online publication. Authors should submit their manuscripts online to <http://mc.manuscriptcentral.com/ngb>. Authors who are unable to submit online should contact either of the Editor-in-Chiefs for assistance. For the purposes of reviewing, high-resolution graphics are not necessary; authors may submit low-resolution or pdf versions, but should ensure that they are of sufficient quality for viewing on-screen or by laser printing. On acceptance, high-resolution versions should be submitted, along with high-quality hard copies, to the publishing office. Full instructions and Help function are available on the site.

Each manuscript will normally be reviewed by at least two referees with relevant scientific experience. Authors may suggest appropriate reviewers, but the final selection of referees shall be made by the Editor-in-Chief. Reviewers are asked to evaluate manuscripts for their scientific merit and clarity of presentation and to voice any concerns related to the welfare of animal and human subjects. Every effort will be made to notify authors of the reviewers' recommendations within six weeks of receipt of a manuscript.

## MANUSCRIPT PREPARATION AND STYLE

Manuscripts must be in English and typed double-spaced. Allow margins of at least 1" (25 mm); do not hyphenate words at the end of lines and do not justify right margins. Numbers should be spelled out when they occur at the beginning of a sentence; use Arabic numerals elsewhere. Abbreviations should be used sparingly and non-standard abbreviations should be defined at their first occurrence. Metric system (SI) units should be used. Manuscripts that do not conform to the style of Neuron Glia Biology will be returned without review. Authors of accepted manuscripts will be requested to provide the Figures both as hard copy and electronically.

## MANUSCRIPT ELEMENTS AND ORDER

Title page: The title should be concise, informative, and free of abbreviations, chemical formulae, technical jargon, and esoteric terms. This page should include (a) the article's full title, (b) full names and affiliations of all authors, (c) the name, mailing address, email address and telephone number of the corresponding author, (d) the address for reprint requests if different from that of the corresponding author and (e) a list of the number of manuscript pages, number of tables, and number of figures.

Abstract: A summary of less than 200 words communicating the primary findings and significance of the research.

Key words: Up to five words for the purposes of indexing, which are not included in the title.

Introduction: State the relevant background to the study to provide the necessary information and context to enable non-specialists to appreciate the objectives and significance of the paper.

Objective: A single paragraph stating the hypothesis to be tested, or the observation or measurement to be made, and the methodological approach that will be taken to achieve the aims.

Methods: Materials and procedures should be described in sufficient detail to enable replication. Results should not be included in the Methods section. This section should be brief but provide sufficient information to permit others to replicate the study. Pertinent details of species, apparatus and equipment, procedures and experimental design should be described. All experiments involving human subjects must be conducted in accordance with principles embodied in the Declaration of Helsinki (Code of Ethics of the World Medical Association). Experiments involving animal subjects must conform to the principles regarding the care and use of animals adopted by the American Physiological Society and the Society for Neuroscience. The Editor-in-Chief may refuse papers that provide insufficient evidence of adherence to these principles.

Results: This section may contain subheadings. Authors should avoid mixing discussion with the results. The results should be presented clearly and concisely, using Figures and Tables to summarize or illustrate the important findings.

Conclusions: The main conclusions that obtain directly and unambiguously from the results should be provided in one to four sentences in outline form. Each conclusion is listed as a declarative sentence in a bulleted paragraph, with one sentence for each conclusion. These should be presented as a simple statement by the author of the facts obtained from the results, without any interpretation, extrapolation, or equivocation.

Discussion: Interpretation of the conclusions with respect to the hypothesis and the significance to the field should be discussed. Careful consideration of the conclusions for accuracy and alternative interpretation, and possible conflicts or resolution of conflicts in the field is encouraged. Limited speculation and directions for future research can be included.

Acknowledgments: Use a separate page to recognize the contributions of individuals and supporting institutions.