



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**MECANISMOS DE DAÑO MITOCONDRIAL Y ESTRATEGIAS DE
RESTAURACIÓN BIOENERGÉTICA POR TRANSFERENCIA MITOCONDRIAL EN
UN MODELO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

CÉSAR ESPINO DE LA FUENTE MUÑOZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

DR. LUIS BERNARDO TOVAR Y ROMO

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

Ciudad Universitaria, Ciudad de México, Enero, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**MECANISMOS DE DAÑO MITOCONDRIAL Y ESTRATEGIAS DE
RESTAURACIÓN BIOENERGÉTICA POR TRANSFERENCIA MITOCONDRIAL EN
UN MODELO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

CÉSAR ESPINO DE LA FUENTE MUÑOZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

DR. LUIS BERNARDO TOVAR Y ROMO
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

Ciudad Universitaria, Ciudad de México, 2022

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

OFICIO CPCB/1221/2021

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **25 de octubre de 2021** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del estudiante **ESPINO DE LA FUENTE MUÑOZ CÉSAR** con número de cuenta **515025840** con la tesis titulada **“Mecanismos de daño mitocondrial y estrategias de restauración bioenergética por transferencia mitocondrial en un modelo de la Enfermedad de Alzheimer”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. MARÍA SOLEDAD FUNES ARGÜELLO
Vocal: DR. JOSÉ FERNANDO PEÑA ORTEGA
Vocal: DR. MARTÍN GUSTAVO PEDRAZA ALVA
Vocal: DRA. GOHAR GEVORGYAN
Secretario: DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 16 de diciembre de 2021

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. Ser parte de su comunidad es uno de mis logros más importantes.

Agradezco el apoyo otorgado por CONACYT (573559), así como al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IN202318) de la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Fundación Miguel Alemán A.C.

Agradezco de manera especial a la Dra. Clorinda Arias Álvarez por aceptarme en su laboratorio y permitirme llevar a cabo este proyecto de investigación. Gracias por la paciencia y las enseñanzas que me brindó durante estos años bajo su tutela académica, por incrementar mi gusto por las neurociencias y las mitocondrias, por contribuir de manera indispensable en mi formación como Doctor en Ciencias, así como por el apoyo que me brindó desde mi primer día en el laboratorio y por confiar en este proyecto. ¡Muchas gracias!

Agradezco a los miembros de mi comité tutorial, a la Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte y al Dr. Luis Bernardo Tovar y Romo. Gracias por sus conocimientos y opiniones que enriquecieron este trabajo y contribuyeron en mi formación como Doctor en Ciencias.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Al Dr. Salvador Uribe Carvajal, quien me permitió realizar los experimentos de bioenergética mitocondrial en su laboratorio y por su ayuda para el análisis de los resultados.

Al Dr. Federico Bermúdez Rattoni, por proporcionarnos algunos de los animales transgénicos utilizados en este trabajo.

A la Dra. Angélica Zepeda Rivera, por sus consejos y comentarios durante mi estancia en el laboratorio.

A la Q.F.B. Patricia Ferrera, por su apoyo técnico en el laboratorio y a la Biol. Sandra Luz Hernández por su apoyo en la utilización de diversos equipos.

A la Dra. Perla Moreno Castilla, por ayudarme en el manejo y la genotipificación de los ratones transgénicos y por la motivación que me has contagiado desde hace años. Gracias a tus pláticas sobre neurociencias nació mi interés por ellas.

A la Dra. Mónica Rosas Lemus, por la paciencia al enseñarme las técnicas de bioenergética mitocondrial y por ampliar mi conocimiento sobre las mitocondrias. Gracias por el tiempo en el laboratorio y por las pláticas musicales que se presentaban entre trazo y trazo. ¡Si te gustan las mitocondrias, dale!

Agradezco a los miembros del jurado para el examen de grado: Dra. María Soledad Funes Argüello, Dr. José Fernando Peña Ortega, Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte, Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva, Dra. Gohar Gevorgyan y Dr. Gilberto Aleph Prieto Moreno. Les agradezco el tiempo e interés para revisar esta tesis de Doctorado.

A mis amigas y compañeras de laboratorio: Nelly, Eva, Abril, Liz, Martha, Manuel, Andrea, Fer, Kari chica, Kari grande, Paulina, Eduardo, Brandon, Iker, Valeria, Isela, Denisse, Elizabeth. Gracias por todo su apoyo dentro y fuera del laboratorio, por las risas, los

momentos de ocurrencias y algunos otros momentos incómodos llenos de imprudencia. Ustedes han hecho que esta experiencia sea doblemente gratificante.

A todos los ratones que fueron utilizados en los experimentos. Gracias a ellos es que la investigación biomédica se mantiene avanzando.

DEDICATORIAS

A mis padres: Graciela Muñoz Aguilar y César Espino De la Fuente. Gracias por su solidaridad y confianza durante estos 31 años, inculcándome amor y respeto. Gran parte de lo que soy se los debo a los dos. Espero que algún día pueda ser como ustedes.

A mi hermana Carmen, por todo tu apoyo durante la vida. Tú y mis papás son las personas que más quiero. A pesar de la distancia física, somos hermanowers metalerowers.

A mis tíos y primos: Nefis, Lulú, Chuy, Nena, Luis, Carlos, Daniel, Luis Felipe, Martha, Toño, Joce, Iris, Lucero, Ade, Perla. Por ser una familia entrañable, brindarme su amor, apoyo y cariño siempre.

A la familia Ortiz Matamoros, por brindarme apoyo, cariño y atenciones. En especial a Alejandra Matamoros Morales y al abuelo Mario Matamoros Rentería, con quienes he compartido gratos momentos.

A Spotz, uno de los pilares más fuertes que he tenido en estos últimos años de manera académica y personal. Gracias por la música, los conciertos, por perrirrio, por lo que me enseñas cada día, por la vida que tenemos. Te admiro, te respeto y te quiero.

A Beethoven y a Ilia, gracias por reglarme incontables momentos de felicidad. Es increíble el cariño que se puede sentir hacía un ser de cuatro patas, no creo que existan palabras o estudios científicos que puedan describirlo.

ÍNDICE

Resumen.....	1
Abstract.....	3
1. Introducción.....	4
1.1. Enfermedad de Alzheimer.....	4
1.2. El péptido A β	6
1.3. Alteraciones genéticas de la EA.....	7
1.4. La proteína tau.....	9
1.5. La Enfermedad de Alzheimer como falla sináptica.....	10
2. Antecedentes.....	12
2.1. Mitocondrias en el cerebro sano.....	12
2.2. Mitocondrias, plasticidad neuronal y cognición.....	14
2.3. Disfunción mitocondrial en la Enfermedad de Alzheimer.....	16
2.4. Transferencia mitocondrial entre células.....	20
2.5. Trasplante mitocondrial.....	23
2.6. Trasplante mitocondrial en el sistema nervioso.....	26
3. Planteamiento del problema.....	29
4. Hipótesis.....	29
5. Objetivos.....	30
5.1 Objetivos particulares.....	30
6. Materiales y métodos.....	31
6.1.1 Modelo Triple Transgénico de la Enfermedad de Alzheimer (3xTg-AD).....	31
6.1.2. Obtención de sinaptosomas.....	32
6.1.3. Consumo de oxígeno y potencial de membrana mitocondrial de sinaptosomas.....	32
6.1.4. Análisis de las proteínas de fusión y fisión mitocondrial.....	33
6.1.5. Análisis por microscopía electrónica.....	34
6.2.1 Cultivos neuronales.....	34
6.2.2. Aislamiento mitocondrial.....	35
6.2.3. Consumo de oxígeno de mitocondrias aisladas.....	36
6.2.4. Transferencia mitocondrial <i>in vitro</i>	36
6.2.5. Infusión hipocampal de mitocondrias.....	37
6.2.6. Inmunofluorescencia.....	37
6.2.7. Evaluación de la capacidad redox mitocondrial.....	38
6.2.8. Pruebas conductuales.....	39
6.2.9. Análisis estadístico.....	39
7. Resultados.....	40
7.1.1. Alteraciones bioenergéticas asociadas con la edad en mitocondrias sinápticas.....	40
7.1.2. Cambios en la dinámica mitocondrial en sinaptosomas de ratones 3xTg-AD.....	42
7.1.3. Acumulación de A β y tau en mitocondrias sinápticas.....	43
7.2.1. Cultivos primarios de neuronas corticales.....	45
7.2.2. Extracción y purificación de mitocondrias corticales.....	45
7.2.3. Transferencia mitocondrial <i>in vitro</i>	47
7.2.4. Trasplante mitocondrial.....	51
8. Discusión.....	54
9. Conclusiones.....	62
10. Referencias bibliográficas.....	63
11. Anexos (artículos publicados).....	80

RESUMEN

La Enfermedad de Alzheimer (EA) produce un decaimiento cognitivo progresivo caracterizado por pérdida de la memoria y tiene como principal factor de riesgo el envejecimiento. La disminución en la densidad sináptica es el mejor correlato histopatológico de la deficiencia cognitiva. En etapas iniciales, este padecimiento se caracteriza por una reducción en el metabolismo energético lo que sugiere que la disfunción mitocondrial es un evento fisiopatológico temprano. Las mitocondrias son esenciales para mantener las funciones neuronales, y cambios en la integridad y actividad mitocondrial contribuyen a las disfunciones sinápticas. Sin embargo, no se conoce con precisión cómo la bioenergética y la dinámica mitocondrial impactan negativamente la fisiología de las sinapsis. Se ha demostrado que las mitocondrias pueden transferirse entre células cerebrales y se ha comenzado a investigar el papel benéfico del trasplante mitocondrial para tratar trastornos del sistema nervioso. En este trabajo analizamos el papel del envejecimiento en la función, la ultraestructura y la dinámica mitocondrial en sinaptosomas de ratones 3xTg-AD. Observamos que las mitocondrias sinápticas del cerebelo, el hipocampo y la corteza cerebral de animales viejos muestran un menor consumo de oxígeno y pérdida del potencial de membrana mitocondrial, aunque permanecen acopladas. Estos cambios se exacerban en los ratones 3xTg-AD. También describimos la activación de la proteína de fisión p-Drp1(Ser616) y cambios ultraestructurales como edema mitocondrial y desarreglo en las crestas mitocondriales acompañado de inclusiones de A β y tau. Con el fin de implementar el trasplante mitocondrial, diseñamos un esquema de aislamiento mitocondrial que preserva funciones mitocondriales esenciales, como el consumo de oxígeno y el potencial de membrana. Este protocolo de aislamiento rápido nos permitió mantener funcionales hasta por tres horas a mitocondrias aisladas de la corteza cerebral y utilizarlas en ensayos de transferencia y trasplante. Logramos introducir mitocondrias exógenas en neuronas corticales *in vitro*, cuya dinámica fue documentada con microscopía confocal y reportamos la incorporación y fusión de mitocondrias exógenas con la red mitocondrial de las neuronas receptoras. En conjunto, nuestros resultados demuestran que existe una disfunción mitocondrial en terminales sinápticas durante el envejecimiento, la cual se agrava en ratones transgénicos de la EA. De manera importante, el aislamiento mitocondrial y su incorporación a células neuronales, abre la posibilidad de emplear el trasplante mitocondrial como una

estrategia para controlar o revertir el daño mitocondrial que describimos en el modelo 3xTg-AD.

ABSTRACT

Mitochondrial activity is essential to support neural functions, and changes in the integrity and activity of the mitochondria can contribute to synaptic damage and neuronal death, especially in Alzheimer's Disease. Reduced mitochondrial function may be an early event that compromises synaptic integrity and neurotransmission in vulnerable brain regions during physiological and pathological aging. Thus, we aimed to measure mitochondrial function in synapses from three brain regions at two different ages in the 3xTg-AD mouse model and in wild mice. We found that aging is the main factor associated with the decline in synaptic mitochondrial function. These findings open the possibility of mitochondrial transplantation in order to reduce bioenergetic deficits observed in aged mitochondria. Based on this, we analyzed the function, ultrastructure, and mitochondrial complex dynamics in synaptosomes of 3xTg-AD mice. In old animals, we observed that synaptic mitochondria remain coupled, but with lower oxygen consumption, as well as with an exacerbated mitochondrial membrane potential in the cerebellum, hippocampus, and cortex, from 3xTg-AD mice, and an increase of p-Drp1(Ser616) levels. We also found that the hippocampal synaptosomes of old 3xTg-AD mice are swollen, showing mitochondrial edema and a derangement in the mitochondrial cristae accompanied by the presence of A β and tau within the mitochondria. We adapted mitochondrial isolation protocol for mitochondria transference and transplantation. The results of oxygen consumption and mitochondrial membrane potential show that mitochondria isolated from the cerebral cortex remain functional three hours after purification, which allows their use for mitochondrial transfer and transplantation assays. We successfully introduced exogenous mitochondria to cultured cortical neurons, as demonstrated by confocal microscopy. Data showed that mitochondria incorporate in two hours, a period where the exogenous mitochondria fuse with the mitochondrial network of cortical neurons. Together, these data demonstrate a loss of mitochondrial function in synaptic terminals with age, which is exacerbated in the AD models. Furthermore, mitochondrial isolation and its incorporation into neuronal cells opens the possibility of using mitochondrial transplantation as a strategy to prevent or even to reverse mitochondrial damage found in the 3xTg-AD model.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Enfermedad de Alzheimer

En 1907, Alois Alzheimer describió los signos clínicos e histopatológicos de una enfermedad que hoy en día se caracteriza por pérdida progresiva de la memoria, disfunción cognitiva, alteraciones de comportamiento, delirios y pérdida de convivencia social, así como una disminución progresiva del lenguaje. Todos ellos en conjunto, fueron reconocidos como una enfermedad que recibió el nombre de Enfermedad de Alzheimer (EA) (Selkoe, 2001).

La EA es la forma más común de demencia en individuos de edad avanzada, se calcula que representa entre el 60% y el 70% de los casos (WHO, 2020). Más de 35 millones de personas en todo el mundo padecen la enfermedad que conduce a la muerte dentro de los 5 a 12 años después de la aparición de los síntomas debido a complicaciones asociadas como movimientos anormales, dificultad para deglutir y pérdida de peso, que conllevan a una incapacidad de vivir de manera independiente (Querfurth and LaFerla, 2010; Vermunt et al., 2019).

En México, la incidencia de la EA es de 27.3 por cada 1,000 personas al año (Gutiérrez-Robledo and Arrieta-Cruz, 2015). Algunos estudios han determinado que es más frecuente en mujeres y el riesgo de desarrollarla incrementa con la presencia de síndrome metabólico, las enfermedades cardiovasculares o la depresión (Gutiérrez-Robledo and Arrieta-Cruz, 2015). En 2014 se registraron 860,000 personas con demencia en México y las estimaciones para el 2050 se acercan a los 3.5 millones de casos para nuestro país. Además, entre 2010 y 2014 se registraron tasas de 65.12 y 43.66 muertes por EA por cada 1,000 individuos. En el periodo estudiado, el grupo etario con las mayores tasas de mortalidad por esta causa fue el de mayores de 80 años (Celis-De la Rosa et al., 2018), por lo que la EA será de gran impacto en los sistemas de salud, económico y social.

Hasta el momento se sabe que la EA es una enfermedad multifactorial que tiene como principal factor de riesgo el envejecimiento. Generalmente, las personas que sufren la EA

son mayores de 65 años y la forma que presentan es esporádica (99% de los casos), sin embargo, existen mutaciones que se han asociado a la EA y que forman parte de la llamada EA familiar (1% de los casos) (Holtzman et al., 2011). Su progresión es estereotípica ya que se ha observado que inicia en la corteza entorrinal, el núcleo basal de Meynert y el núcleo cerúleo, progresando hacia el hipocampo para después afectar el resto de la corteza cerebral (Arendt et al., 2015).

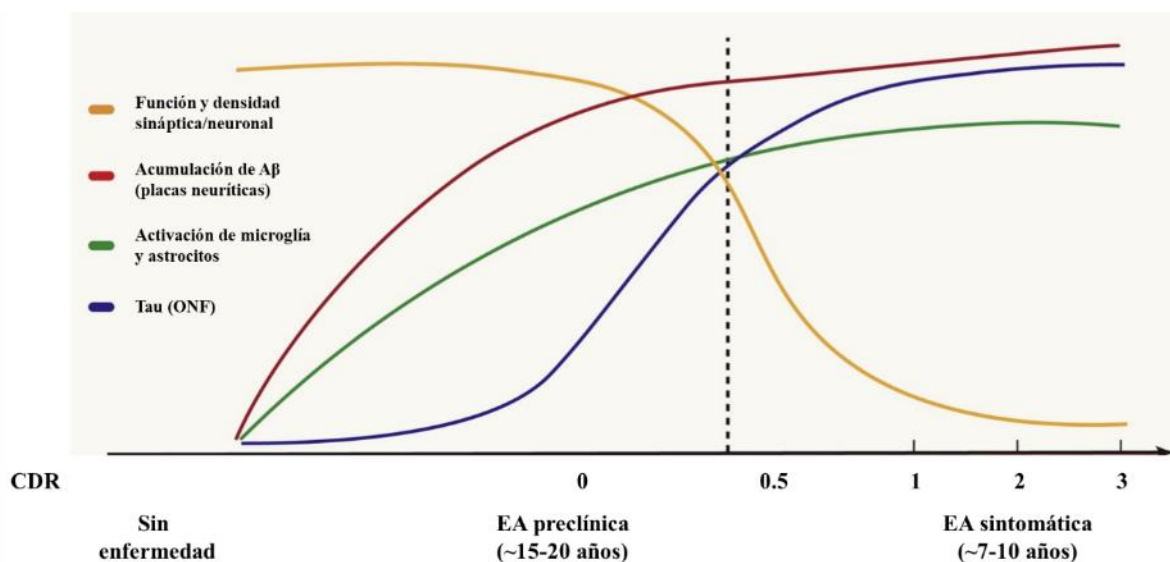


Figura 1. Principales eventos fisiopatológicos de la EA. La fase preclínica se caracteriza por la acumulación temprana de A β , así como cambios neuro-inflamatorios tempranos y la propagación de ovillos neurofibrilares (ONF). La fase sintomática se caracteriza por la disfunción sináptica, la pérdida de sinapsis y la neurodegeneración. El inicio y la progresión del deterioro cognitivo se correlacionan con la acumulación de tau y la pérdida de volumen del hipocampo. CDR: Clasificación Clínica de Demencia (por sus siglas en inglés), donde una puntuación de 0 indica una cognición normal y las puntuaciones de 0,5, 1, 2 y 3 indican los grados de demencia; cuestionable, leve, moderado y severa, respectivamente. (Imagen modificada de Long y Holtzman, 2019).

A nivel estructural, la EA en etapas avanzadas se caracteriza por una atrofia generalizada del cerebro, pérdida sináptica y muerte neuronal, mientras que, a nivel molecular, las características de la enfermedad son las placas amiloideas y los ovillos neurofibrilares (ONF). Las placas amiloideas se acumulan en el espacio extracelular y se componen principalmente de agregados insolubles del péptido amiloide beta (A β). Estas placas se observan cerca de neuritas en degeneración, además, en las zonas que rodean las placas neuríticas, también se presenta proliferación de astrocitos y microglía (Long and Holtzman, 2019) (Figura 1). La pérdida sináptica, que ocurre de manera temprana en la enfermedad, se considera que es el mejor correlato con las manifestaciones conductuales de la demencia (Selkoe, 2002).

1.2. El péptido A β

El A β es un péptido de 36 a 43 aminoácidos que se obtiene como producto natural de la proteólisis de la proteína precursora del amiloide (APP), altamente expresada en el sistema nervioso central (SNC).

La APP es cortada a través de dos vías: la vía no amiloidogénica y la vía amiloidogénica. La no amiloidogénica involucra la actividad de una α -secretasa (ADAM10), que produce la liberación del ectodominio soluble de APP (sAPP α) y la generación de un fragmento C-terminal truncado (α -CTF o C-83), cortado posteriormente por la γ -secretasa. Dado que el corte por α -secretasa trunca al fragmento A β , la vía no amiloidogénica resulta en la generación de péptidos denominados p3 (Haass et al., 2012). Por el contrario, en la vía amiloidogénica, la APP se corta por las enzimas β -secretasa (BACE-1) y γ -secretasa, lo que da como resultado la producción del A β . El primer corte llevado a cabo por BACE-1, resulta en la liberación de un ectodominio soluble (sAPP β) y un fragmento C-terminal que se queda anclado a la membrana (β -CTF o C-99). El segundo corte es mediado por γ -secretasa, la cual corta al β -CTF dentro del dominio transmembranal promoviendo la liberación del péptido A β al medio extracelular (Haass et al., 2012) (Figura 2). En ambas vías, se producen dominios intracelulares (AICDs). Se ha propuesto que los AICDs tienen funciones fisiológicas como la modulación de la plasticidad sináptica, la señalización de calcio, la dinámica del citoesqueleto, la expresión genética y la apoptosis (Bukhari et al., 2017).

El A β se ha encontrado en todos los vertebrados examinados hasta el momento y su secuencia molecular muestra un alto grado de conservación. Como sus funciones fisiológicas se han descrito las de proteger al cerebro de infecciones, reparar fugas en la barrera hematoencefálica, promover la recuperación de lesiones y regular la función sináptica (Brothers et al., 2018). Sin embargo, un desequilibrio entre la producción y degradación de A β parece ser un factor importante para su acumulación y contribución a la patogénesis de la EA. El A β forma agregados en múltiples formas físicas. Las placas amiloideas, están formadas principalmente por A β en su forma fibrilar, sin embargo, las formas oligoméricas

son las más neurotóxicas (Walsh and Selkoe, 2007), se asocian con el deterioro cognitivo y se encuentran elevados en cerebros de pacientes con la EA (Gong et al., 2003).

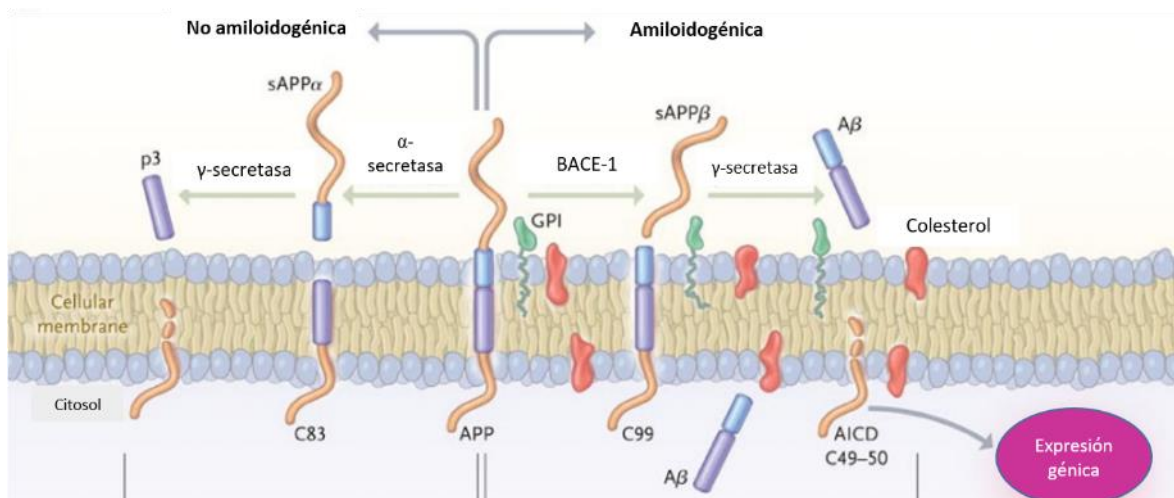


Figura 2. Vías de procesamiento de la APP. La vía no amiloidogénica que genera fragmentos p3, mientras que la vía amiloidogénica promueve la secreción del péptido Aβ al espacio extracelular (Imagen modificada de LaFerla y Querfurth, 2011).

Aunque la producción de Aβ se lleva a cabo predominantemente en la membrana y es liberado al espacio extracelular, su formación puede ocurrir dentro de la célula potencialmente en cualquier lugar donde se localice APP, BACE-1 y γ-secretasa. En este sentido, se sabe que APP está presente en la red trans-Golgi y el retículo endoplásmico (Greenfield et al., 1999), los lisosomas (Tam et al., 2014) y las membranas mitocondriales (Manczak et al., 2006). En las últimas décadas, un gran número de estudios en pacientes con EA y en cerebros de ratones transgénicos han proporcionado evidencia de la presencia del Aβ intra neuronal que contribuye a la patología y posiblemente participa en la disfunción sináptica (LaFerla et al., 2007) y mitocondrial (Manczak et al., 2006).

1.3. Alteraciones genéticas de la EA

El 1-2% de los casos de la EA ocurren de manera hereditaria, se presentan de manera temprana y se relacionan con mutaciones en los genes de tres proteínas particulares: la APP,

la presenilina 1 (PSEN1) y la presenilina 2 (PSEN2), las cuales alteran el procesamiento normal de APP incrementando la producción de A β (Long and Holtzman, 2019).

La mutación sueca de APP consiste en la sustitución doble de lisina/metionina por asparagina/leucina en las posiciones 670/671 ocasionando que la cantidad de A β incremente de dos a tres veces por afectar la eficiencia de escisión de BACE1 (Schellenberg and Montine, 2012). Otra mutación es la denominada inglesa, en la que existe un cambio de valina por isoleucina en la posición 717, ésta altera el corte por γ -secretasa aumentando la proporción de A β 42/A β 40. Por otro lado, la mutación ártica (glutamato por glicina en la posición 693) no altera el sitio de escisión de γ -secretasa o la cantidad de A β , pero incrementa la velocidad de agregación del péptido (Bergmans and De Strooper, 2010). Por su parte, las mutaciones en PSEN1 son la causa más común de la EA de inicio temprano y se asocian con una variante morfológica de agregados llamados placas de lana de algodón que se producen en las mismas regiones del cerebro que los depósitos típicos de A β (Houlden et al., 2000). Las mutaciones en PSEN2 tienen una incidencia baja en la EA pero aumentan la cantidad de A β 42 así como la actividad de BACE1 a través de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Park et al., 2012).

También se han identificado que polimorfismos en los genes de APOE y SORL1 aumentan el riesgo de padecer la EA. El gen APOE codifica para la apolipoproteína E (ApoE) relacionada con el transporte de lípidos, la función sináptica y la señalización intracelular (Mahley and Rall, 2000). En los humanos se presentan tres alelos de APOE que codifican para sus correspondientes isoformas, y se ha descrito que los individuos homocigotos para el alelo APOE ϵ 4 tienen entre el 50% y 90% de probabilidad de desarrollar la enfermedad entre los 60 y 70 años en comparación con los otros alelos (Verghese et al., 2011). ApoE ϵ 4 presenta alta afinidad por A β y eleva su toxicidad de forma sinérgica (Ye et al., 2005). Por otro lado, SORL1 es un gen que codifica para sortilina, un receptor que participa en el tráfico vesicular, la eliminación del A β y como receptor para la ApoE (Yin et al., 2015). Este gen se ha asociado con la EA ya que polimorfismos de un solo nucleótido se han identificado en mayor proporción en pacientes con EA en estudios de diferentes poblaciones (Wen et al., 2013). Así mismo, se ha descrito que existe una disminución de la proteína sortilina en la

corteza y en el hipocampo de individuos con la EA asociada con la gravedad del deterioro cognitivo (Sager et al., 2007; Scherzer et al., 2004).

1.4. La proteína tau

La proteína tau está codificada por el gen MAPT en el cromosoma 17, tiene seis isoformas distintas en el adulto y se expresa principalmente en neuronas del SNC. El papel fisiológico de tau comprende principalmente el ensamblaje de microtúbulos, la estabilización de los axones neuronales y la regulación del transporte a través de microtúbulos (figura 3) (Barbier et al., 2019).

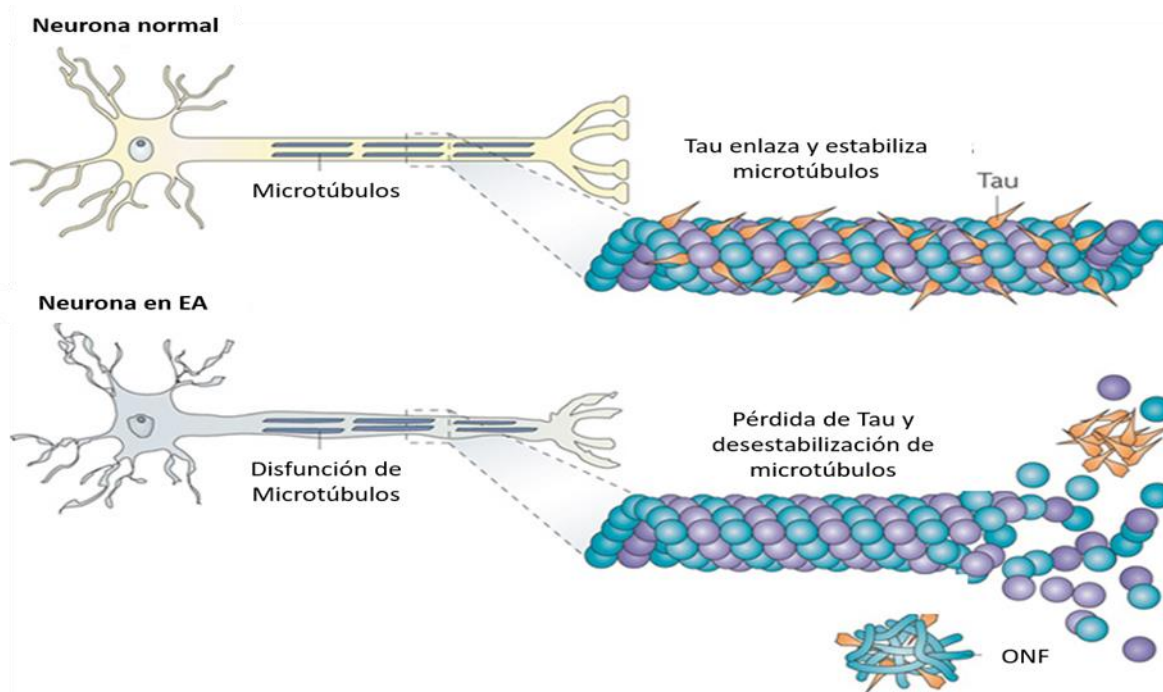


Figura 3. La proteína tau. Tau facilita la estabilización de los microtúbulos en las neuronas y son esenciales para el transporte normal a través de los axones. En la EA la función de tau se ve comprometida debido a su hiperfosforilación, que reduce la unión a los microtúbulos y promueve la formación de ONFs (modificado de Brunden et al., 2009).

La proteína tau se puede fosforilar en 85 residuos diferentes (Guo et al., 2017) y se ha propuesto que un aumento en la fosforilación da como resultado una disminución en su afinidad de unión con los microtúbulos (Biernat et al., 1993), promoviendo su desensamble, y participando en su agregación y fibrilización. La tau hiperfosforilada también se redirige desde el compartimento axonal al compartimento somatodendrítico, donde puede afectar la

función sináptica al inhibir el tráfico del receptor de glutamato o el anclaje sináptico (Hoover et al., 2010). Entre las quinasas que fosforilan a tau destacan la glucógeno sintasa quinasa (GSK3), la quinasa 5 dependiente de ciclina (Cdk5) y la calcio calmodulina quinasa II (CaMKII) entre otras (Guo et al., 2017). Además, varias fosfatasas han sido implicadas en la desfosforilación de tau, siendo PP2A la más importante, ya que representa el 70% de la actividad fosfatasa en el cerebro y cuya actividad se reduce en pacientes con EA (Gong et al., 1993).

Generalmente tau es una proteína soluble que bajo condiciones patológicas puede agregarse en oligómeros y fibrillas. Los ONF contienen una forma insoluble de tau agregada en fibrillas polimórficas conocidas como filamentos helicoidales pareados (PHF, por sus siglas en inglés) (Frost et al., 2009). Varios estudios han demostrado la capacidad de las fibrillas de tau humana para propagarse, lo que permite que los agregados se diseminen trans sinápticamente a regiones cerebrales anatómicamente conectadas (Clavaguera et al., 2009; De Calignon et al., 2012; Dujardin et al., 2014; Liu et al., 2012). La propagación de tau ha permitido la estadificación de Braak que correlaciona con la progresión del deterioro cognitivo (Braak and Braak, 1991). De manera reciente, estudios longitudinales y transversales que emplean imágenes de tomografía por emisión de positrones (PET, por sus siglas en inglés), así como resonancia magnética estructural, han determinado que la presencia o acumulación de tau fue un predictor de deterioro cognitivo, mientras que la presencia o acumulación de A β fue un predictor de patología tau más grave (Aschenbrenner et al., 2018; Hanseeuw et al., 2019). Estos hallazgos han generado la hipótesis de que el deterioro cognitivo y la neurodegeneración en la EA son impulsados principalmente por la presencia y propagación de tau.

1.5. La Enfermedad de Alzheimer como falla sináptica

El deterioro cognitivo en la EA se ha asociado con alteraciones en los niveles de varios neurotransmisores. Por ejemplo, la adición de A β a neuronas hipocampales causa una reducción en los niveles de los receptores para glutamato tipo NMDA (N-metil-D-aspartato), como resultado de su endocitosis de la superficie celular (Snyder et al., 2005) y en cultivos

organotípicos de hipocampo el A β deprime la transmisión excitatoria mediada por receptores para glutamato tipo AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico) y NMDA (Kamenetz et al., 2003). También se ha descrito deficiencia de proyecciones colinérgicas provenientes del núcleo basal de Meynert (Davies and Maloney, 1976) y su correlación con la acumulación de A β , ya que éste se une a los receptores nicotínicos de acetilcolina impidiendo el mantenimiento de la potenciación a largo plazo (LTP, por sus siglas en inglés) (Wang et al., 2000).

En 2002, Selkoe planteó que la EA puede derivar de un daño sináptico de manera inicial. En particular, se ha encontrado que la densidad de sinapsis del hipocampo disminuye en personas con deterioro cognitivo leve. Además, se presenta una reducción del 25% al 35% de las sinapsis de la corteza temporal y frontal (Davies et al., 1987), así como una reducción en los niveles de proteínas sinápticas como sinaptofisina, sinaptotagmina y GAP43 (Masliah et al., 2001). En el envejecimiento normal existe una disminución en el número de sinapsis, sin embargo, en la EA las sinapsis se pierden de manera desproporcionada en relación con las neuronas, lo que sugiere que la pérdida de terminales sinápticas precede a la muerte neuronal. Esta pérdida sináptica es el mejor correlato que existe con la deficiencia cognitiva (Selkoe, 2002).

¿Qué determina el daño sináptico que ocurre de manera acelerada en la EA? Aunque hay varias hipótesis, una de ellas se enfoca en la continua demanda energética y la gran cantidad de procesos que se requiere llevar a cabo para mantener gradientes iónicos, liberación de neurotransmisores y síntesis de proteínas para eventos de plasticidad, entre otros. Es por eso que se han desarrollado estudios sobre el papel de la disfunción mitocondrial en la pérdida sináptica y en la muerte neuronal en la EA.

2. ANTECEDENTES

2.1. Mitocondrias en el cerebro sano

Las mitocondrias son organelos presentes en casi todas las células eucariotas, ocupan hasta el 20% del volumen citoplasmático y son las responsables de proporcionar la energía necesaria para la sobrevivencia de las células. Generalmente tienen forma ovoide con diámetros entre 0.5 y 1µm y se caracterizan por la presencia de dos membranas que forman cuatro compartimentos distintos: la matriz mitocondrial, la membrana interna, la membrana externa y el espacio intermembrana. Son sumamente dinámicas, cambian constantemente de forma y localización dentro de la célula mediante los procesos de fisión, fusión y transporte. Además, son los únicos organelos de las células animales que tienen su propio DNA (mtDNA) el cual es circular y codifica para 13 subunidades de los complejos de la cadena de transporte de electrones (CTE) (Raffaello and Rizzuto, 2011). Las mitocondrias utilizan el NADH en la CTE y la fosforilación oxidativa para producir ATP a través de un potencial electroquímico, que constituye la fuerza utilizada por la ATP sintasa para la generación de ATP (Mitchell, 1961). Durante este proceso, los electrones son transportados desde el NADH hasta el oxígeno por medio de complejos respiratorios y transportadores de electrones los cuales están embebidos en la membrana interna mitocondrial.

El SNC tiene una tasa metabólica muy alta, ya que consume alrededor del 20% del oxígeno que se inspira en reposo y el 25% del total de la glucosa de todo el cuerpo (Erecinska et al., 2004; Silver and Erecińska, 1998). Esta demanda metabólica se debe a que las neuronas necesitan grandes cantidades de ATP para el mantenimiento de gradientes iónicos a través de las membranas celulares, el amortiguamiento de calcio intracelular (Rizzuto, 2001) y la neurotransmisión (Levy et al., 2003) en donde el ATP es utilizado para dirigir el desmontaje de los complejos SNARE (receptores de proteínas de fijación soluble de NSF) y el reciclamiento vesicular (Murthy and Camilli, 2003).

Debido a su especialización morfológica y funcional, las neuronas no muestran una distribución uniforme de mitocondrias. Las áreas de demanda alta de ATP, como las

terminales presinápticas, el cono de crecimiento axonal y los nodos de Ranvier, contienen más mitocondrias que otras partes de la neurona (Perkins et al., 2010; Smith and Gallo, 2018). Si bien la biogénesis mitocondrial se puede producir en el axón, se piensa que la mayoría de las mitocondrias se generan en el soma, por lo que la neurona requiere de mecanismos especializados para su transporte. Dichos mecanismos están mediados por kinesinas para el movimiento anterógrado, y dineínas en el caso del movimiento retrógrado, además de proteínas acopladoras como miro, milton y sintafilina que sirven como motores de desplazamiento y paro sobre el citoesqueleto de la neurona (Hollenbeck and Saxton, 2005). Además de su transporte, las mitocondrias exhiben numerosos eventos de fusión y fisión, fenómenos que en conjunto se ha definido como “dinámica mitocondrial” (Figura 4) (Chen and Chan, 2009).

La fusión proporciona un mecanismo por el cual la población de mitocondrias se mantiene homogénea y facilita el intercambio del mtDNA y el contenido mitocondrial. Estos eventos están regulados por mitofusinas (Mfns) y la proteína de la atrofia óptica 1 (OPA1, por sus siglas en inglés) (Chen et al., 2007). Las Mfns facilitan el anclaje de las membranas externas y las fusionan (Ishihara et al., 2006) mientras que OPA1 es responsable del remodelado y la unión de las crestas mitocondriales así como la fusión de la membrana interna mitocondrial (Chen and Chan, 2009). Por otro lado, la fisión mitocondrial permite eliminar mitocondrias dañadas de la célula (Kim et al., 2007) y ha sido implicada procesos de diferenciación y formación de sinapsis y espinas dendríticas (Li et al., 2004). No obstante, el aumento excesivo en la fisión mitocondrial puede provocar una deficiencia para generar ATP, aumentar la producción de ERO y con ello incrementar la susceptibilidad de las células para sufrir apoptosis (Parone et al., 2008). La fisión está regulada por la proteína tipo dinamina 1 (Drp1, por sus siglas en inglés) y la proteína de fisión mitocondrial 1 (Fis1, por sus siglas en inglés). Drp1 es una proteína citoplasmática que es reclutada por Fis1 en los sitios de fisión de la membrana externa mitocondrial, formando complejos en forma de anillos que constriñen a la mitocondria facilitando la escisión de la doble membrana (Smirnova et al., 2001) Recientemente se han definido dos tipos de fisión mitocondrial: La fisión mitocondrial por la zona media, es decir en el centro del orgánulo y la fisión periférica que ocurre en los extremos de las mitocondrias. Ambos tipos ocurren con frecuencia en células Cos-7 de

monos, sin embargo, la fisión de la zona media ocurre en mitocondrias sanas mientras que la fisión periférica se lleva a cabo cuando una parte de la mitocondria presenta una disminución del potencial de membrana y un aumento de ERO (Kleele et al., 2021).

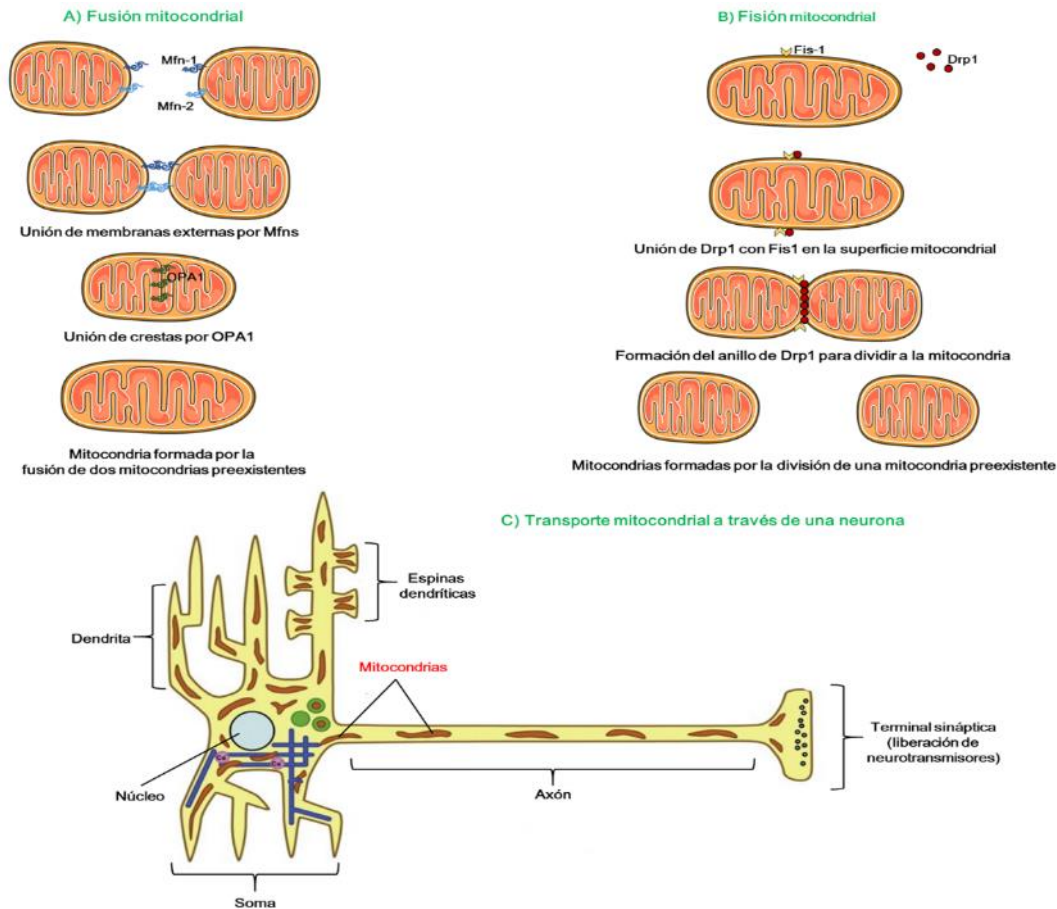


Figura 4. Dinámica mitocondrial. A) La fusión es regulada por mitofusinas, proteínas que se encuentran en la membrana externa mitocondrial y que se encargan de fusionar a una o más mitocondrias, mientras que OPA-1 se encuentra inmersa en la membrana interna y participa en la unión de estas membranas para terminar la fusión. B) La fisión está regulada principalmente por Drp1, una GTPasa citosólica que se ensambla a los receptores Fis1 en los sitios de división de la membrana externa mitocondrial. C) El transporte mitocondrial está mediado por kinesinas y dineínas que conducen el movimiento de las mitocondrias a través de la neurona para llegar a sitios de alta demanda energética (modificado de Van Laar and Berman, 2013).

2.2. Mitocondrias, plasticidad neuronal y cognición

La plasticidad neuronal puede definirse como la serie de adaptaciones estructurales y funcionales de los circuitos neuronales, a los cambios debidos al aprendizaje, la memoria, el ambiente o el daño cerebral; lo que subyace a la capacidad del cerebro para adecuarse a un entorno en constante cambio (Todorova and Blokland, 2016).

Se ha descrito que durante la LTP, la producción de energía mitocondrial aumenta, así como la expresión de genes mitocondriales (Abraham et al., 2002; Todorova and Blokland, 2016). Estas observaciones son consistentes con los experimentos donde el bloqueo de la fosforilación oxidativa conduce al decremento de la LTP (Cunha et al., 1996). De la misma manera, utilizando el desacoplante mitocondrial carbonil cianuro-p-(trifluorometoxi) fenilhidrazona (FCCP) o inhibiendo el complejo I mitocondrial con la toxina rotenona, se produce una menor liberación de vesículas en sinaptosomas (Ivannikov et al., 2013). Además, se encontró que la inducción de LTP provoca una ráfaga rápida de fisión mitocondrial en las dendritas, la cual es inducida por la activación de la calcio calmodulina quinasa II (CaMKII) y la fosforilación de Drp1, sugiriendo que la inducción de LTP requiere de una fisión mitocondrial rápida (Divakaruni et al., 2018). Recientemente, se demostró que la plasticidad sináptica también depende de la traducción local de proteínas impulsada por mitocondrias dendríticas, las cuales sirven como reservas de energía espacialmente confinadas (Rangaraju et al., 2019).

Se ha demostrado una relación entre la morfología mitocondrial, la función cognitiva y el envejecimiento, ya que los sinaptosomas de monos viejos tienen numerosas mitocondrias en forma de dona, lo que es indicativo de estrés mitocondrial (Ahmad et al., 2013; Hara et al., 2014). Esta morfología alterada se correlaciona con una memoria de trabajo reducida, una pérdida sináptica y un número reducido de vesículas, lo que sugiere que los cambios morfológicos afectan la funcionalidad mitocondrial e influyen en la disminución del rendimiento cognitivo durante el envejecimiento (Hara et al., 2014; Picard and McEwen, 2014). El control de calidad mitocondrial también está involucrado en el desempeño cognitivo. La proteína mitocondrial PINK1 (del inglés PTEN-induced kinase 1) que regula la mitofagia, tiene efectos positivos sobre el aprendizaje y la memoria, y su ablación genética provoca disfunción en la ejecución de tareas cognitivas (Du et al., 2017). Apoyando estos datos, se ha demostrado que la estimulación de la mitofagia revierte el deterioro de la memoria observado en varios modelos de la EA (Fang et al., 2019).

Las evidencias mencionadas son algunos ejemplos de la relevancia de la función mitocondrial en la neurotransmisión, el amortiguamiento de Ca^{2+} y la señalización, los cuales

son esenciales para la plasticidad sináptica y la cognición. Por lo tanto, la función mitocondrial alterada durante el envejecimiento y en varias enfermedades neurodegenerativas, puede estar asociada con el deterioro cognitivo y la pérdida de memoria, como se muestra a continuación.

2.3. Disfunción mitocondrial en la Enfermedad de Alzheimer

Como se mencionó anteriormente, la actividad mitocondrial es esencial para llevar a cabo las funciones neuronales, y los cambios en la integridad y la actividad de las mitocondrias pueden contribuir al daño sináptico y la muerte neuronal en enfermedades neurodegenerativas asociadas con la edad como la EA.

En relación con ello, se ha descrito que en los cerebros de pacientes con la EA, el número de mitocondrias, así como las crestas mitocondriales disminuyen (Hirai et al., 2001), se presenta un aumento en el contenido de las proteínas que regulan la fisión mitocondrial y una disminución en los niveles de las proteínas que dan lugar a la fusión (Manczak et al., 2011; Wang et al., 2009). Por otro lado, en los cerebros de pacientes con la EA la actividad de algunas enzimas del ciclo de Krebs disminuye, así como la cantidad de ATP, la actividad de la ATP sintasa y los complejos I, III y IV (Bosetti et al., 2002; Butterworth and Besnard, 1990; Mastrogiacomo et al., 1996).

Muchos trabajos han confirmado las implicaciones de la alteración mitocondrial en modelos de EA. Por ejemplo, cuando neuronas hipocampales de rata son tratadas con A β , la densidad de las neuritas y la longitud de las mitocondrias disminuyen (Wang et al., 2009). De manera similar, en células de neuroblastoma que sobreexpresan mutantes de APP se observa un incremento en la fragmentación mitocondrial relacionada con Fis1 y un cambio en la distribución mitocondrial hacía la zona perinuclear (Wang et al., 2008b). Por su parte, en ratones mAPP se presenta una disminución en la actividad enzimática de la citocromo c oxidasa, un aumento del estrés oxidante, así como una desregulación en el transporte axonal (Du et al., 2010) similar a lo reportado en ratas transgénicas que sobre expresan APP humana mutada (Adami et al., 2017).

Por otro lado, se ha documentado la interacción de Drp1 con A β en ratones que sobreexpresan APP y en pacientes con la EA, lo que sugiere que la interacción entre ambas proteínas es un factor relevante para la fragmentación anormal de las mitocondrias y la disfunción mediada por A β (Manczak et al., 2011). También se ha observado que existe una disfunción bioenergética en mitocondrias aisladas de cerebros del ratón triple transgénico de la Enfermedad de Alzheimer (3xTg-AD) (Yao et al., 2009) y un desbalance en la dinámica mitocondrial y en el potencial de membrana mitocondrial en ratones 5xFAD (Wang et al., 2016) (figura 5).

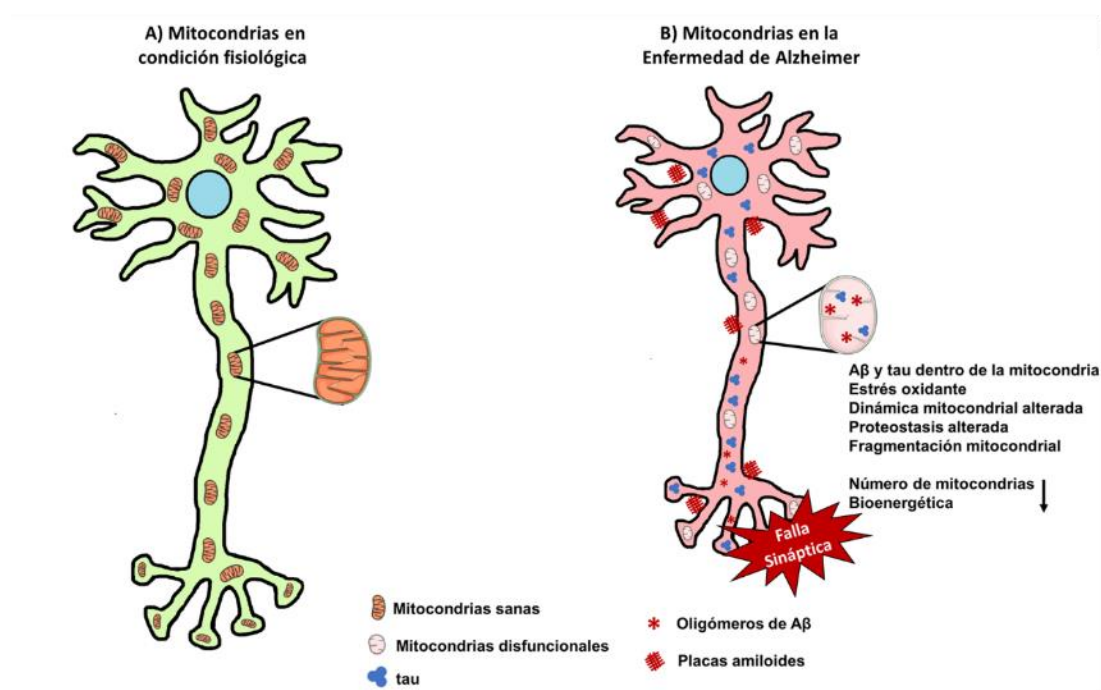


Figura 5. Mitocondrias en la EA. A) Las mitocondrias en condiciones fisiológicas son importantes para mantener las funciones neuronales como la neurotransmisión. B) En pacientes la disfunción mitocondrial juega un papel importante en el daño sináptico y la muerte neuronal, se presenta la acumulación de A β en dentro de las mitocondrias y en consecuencia una falla sináptica.

Se ha demostrado que el A β puede localizarse en la matriz mitocondrial así como en la superficie de la membrana externa (Cenini et al., 2016; Hansson Petersen et al., 2008) (figura 6), y se ha sugerido que puede ser transportado hacia el interior de la mitocondria por la translocasa de la membrana externa (TOM, por sus siglas en inglés) donde su acumulación puede bloquear el tráfico de proteínas del citoplasma a la matriz mitocondrial (Devi et al., 2006; Hansson Petersen et al., 2008; Manczak et al., 2006). A pesar de que se ha identificado una forma de APP en la mitocondrias, éstas no poseen el aparato enzimático para producir

A β (Mamada et al., 2017), ya que el APP mitocondrial se escinde en el espacio intermembrana por la proteasa Omi, que genera un fragmento diferente al A β (Park et al., 2006).

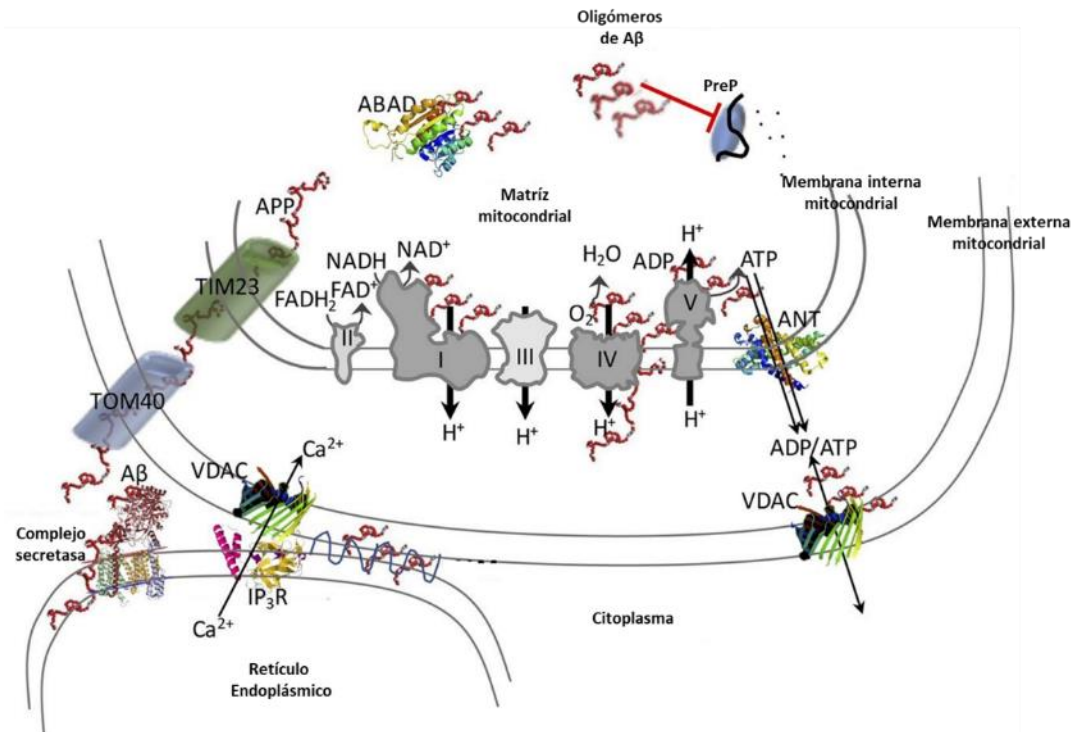


Figura 6. Interacción de A β en las mitocondrias. APP y A β pueden ingresar a las mitocondrias a través de los complejos de importación TOM y TIM. Dentro de las mitocondrias la interacción de A β se da con la cadena de transporte de electrones y en la superficie de la membrana externa mitocondrial. PreP y ABAD son dianas de oligómeros A β que se han descrito dentro de la matriz (modificado de Kawamata and Manfredi, 2017).

El A β también se puede producir en las membranas asociadas a mitocondrias (MAM's, por sus siglas en inglés), que son sitios de contacto y comunicación entre las mitocondrias y el retículo endoplásmico (RE), y participan en diversas funciones celulares como la biosíntesis de lípidos, la fisión mitocondrial y la homeostasis celular de calcio (Fonseca et al., 2015; Raturi and Simmen, 2013). En fibroblastos de modelos transgénicos y pacientes con la EA, se observó mayor número de MAM's, sugiriendo que el aumento en los contactos entre mitocondrias y RE podría ser un factor importante para la producción elevada de A β y su importación en las mitocondrias (Area-Gomez and Schon, 2016).

Una vez que el A β ha sido importado en la mitocondria, causa alteraciones en la fosforilación oxidativa. Existe evidencia de que el complejo IV se inhibe de manera directa por la unión

de A β (Atamna and Boyle, 2006; Crouch et al., 2006; Hernandez-Zimbron et al., 2012). Además, se ha identificado una interacción física entre la ATP sintasa y el A β que provoca la pérdida de su función tanto en pacientes como en modelos de ratones transgénicos (Beck et al., 2016). Por otro lado, A β también tienen un efecto perjudicial en las proteasas de la matriz mitocondrial como PreP, ya que la acumulación de A β en la mitocondria disminuye su actividad enzimática produciendo una proteostasis mitocondrial alterada (Alikhani et al., 2011; Mossmann et al., 2014).

Por su parte, la proteína tau también ha sido asociada con alteraciones mitocondriales reportadas en la EA. Varias observaciones en modelos celulares y en ratones transgénicos, muestran que la sobreexpresión y la hiperfosforilación de tau afectan la localización y distribución de las mitocondrias, producen defectos en la función axonal (Kourosh Shahpasand et al., 2012) y ocasionan pérdida de sinapsis (Cabezas-Opazo et al., 2015). También se ha demostrado que tau hiperfosforilada puede interactuar de manera anormal con Drp1 provocando la fisión mitocondrial excesiva y la degeneración de la sinapsis en ratones 3xTg-AD (Manczak and Reddy, 2012). Así mismo, diferentes formas truncadas de tau reducen los niveles de Opa1, lo que altera la remodelación de las crestas mitocondriales y la eficiencia de la CTE (Pérez et al., 2018), mientras que la sobreexpresión de tau disminuye la actividad de los complejos respiratorios y las enzimas antioxidantes (Cheng and Bai, 2018). La proteína tau se puede unir a la membrana externa de la mitocondria y afectar el potencial de membrana mitocondrial (Atlante et al., 2008) principalmente por la unión con la proteína del canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC1, por sus siglas en inglés) lo que puede alterar el equilibrio entre la apertura y el cierre de los poros mitocondriales y conducir a una disfunción mitocondrial (Manczak and Reddy, 2012). Por último, estudios proteómicos y funcionales en ratones que sobreexpresan la mutante P301 de tau, muestran una disminución en la actividad de los complejos mitocondriales, además de que los cerebros de estos ratones presentan un incremento en la producción de ERO y despolarización mitocondrial (David et al., 2005; Rhein et al., 2009).

2.4. Transferencia mitocondrial entre células

Desde hace varios años se ha descrito que existe la transferencia de mitocondrias entre células y que ésta ocurre de forma fisiológica. Dicha transferencia consiste en la incorporación de mitocondrias funcionales a la red mitocondrial de una célula receptora, provenientes de una donante, ocasionando generalmente una mejoría en el funcionamiento mitocondrial y celular.

Hasta el momento se sabe que la transferencia mitocondrial ocurre de manera fisiológica, pero se incrementa durante el daño en células de mamíferos (Berridge et al., 2016). Por ejemplo, los trabajos pioneros demostraron que el mtDNA puede ser liberado y absorbido por las células para restaurar la función mitocondrial (Spees et al., 2006). Posteriormente, en modelos *in vivo* de lesión pulmonar inducida por lipopolisacáridos (LPS), se mostró que las mitocondrias derivadas de células madre de la médula ósea se transportan a células epiteliales pulmonares, rescatando la respiración y los niveles de ATP celular (Islam et al., 2012). Además, algunos estudios *ex vivo* establecieron que las mitocondrias liberadas de plaquetas pueden ser absorbidas por las células β -pancreáticas, lo que promueve la proliferación y mejora la función celular (Zhao et al., 2017). La transferencia mitocondrial también ocurre en el SNC a través de un fenómeno llamado transmitofagia. Este proceso implica la formación de protuberancias en los axones neuronales del nervio óptico, que contienen mitocondrias dañadas que son liberadas y enseguida capturadas por astrocitos para su degradación (Davis et al., 2014). Por su lado, los astrocitos también pueden donar mitocondrias funcionales a las neuronas después de la privación de glucosa y oxígeno para proporcionar neuroprotección (Hayakawa et al., 2016).

Hasta la fecha, se han encontrado al menos tres mecanismos por los cuales ocurre el intercambio mitocondrial entre células: la formación de nanotubos de tunelización (TNT's, por sus siglas en inglés), el transporte mediado por vesículas (figura 7) y la fusión celular, aunque esta última rara vez ocurre de forma natural (Murray and Krasnodembskaya, 2019; Torralba et al., 2016).

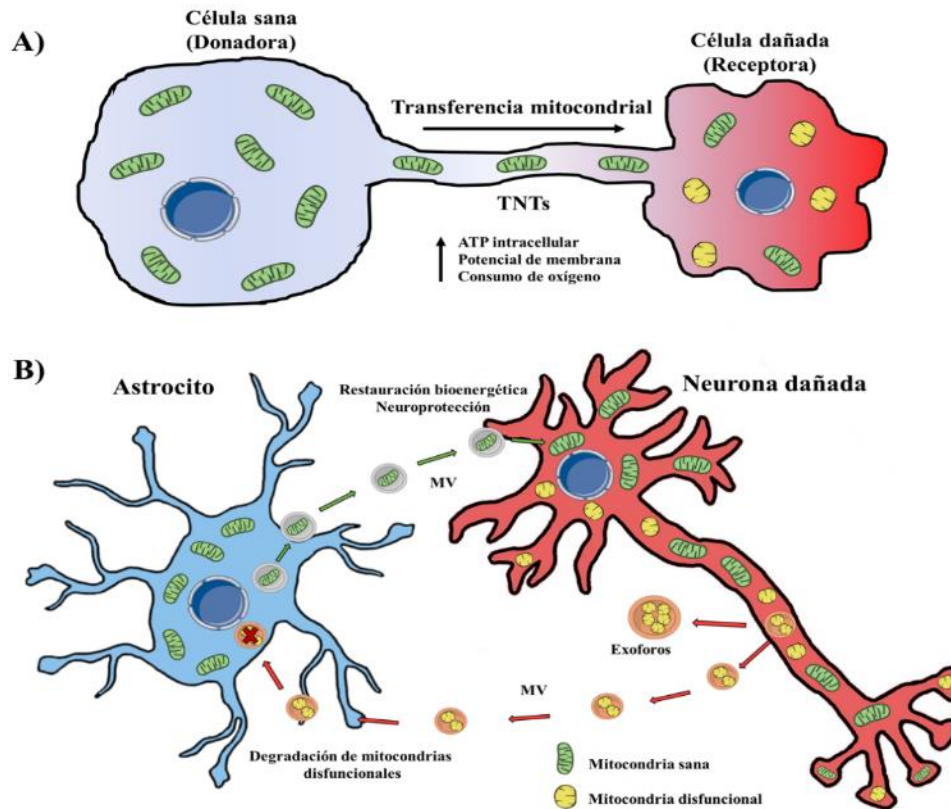


Figura 7. Mecanismos de transferencia mitocondrial. A) Los TNT's son extensiones del citoesqueleto de actina que forman canales de comunicación entre las células y las conectan, lo que permite el intercambio del contenido intercelular. B) Las vesículas extracelulares se utilizan para la comunicación entre células. En el sistema nervioso, las células pueden recibir y donar mitocondrias funcionales a través de micro vesículas (modificado de Espino De La Fuente-Muñoz and Arias, 2021).

Los TNT's son conexiones dinámicas formadas por extensiones del citoesqueleto de actina que forman canales de comunicación entre células con un diámetro aproximado entre 50 y 200 nm (Dupont et al., 2018). Estos nanotubos hacen contacto físico con células adyacentes y las conectan, permitiendo el intercambio de contenido intercelular (Sisakhtnezhad and Khosravi, 2015) (figura 7). Aunque se ha demostrado que los lisosomas se pueden transferir entre células a través de este mecanismo (Rustom et al., 2004), los TNT's tienen un papel importante en la transferencia mitocondrial, ya que su inhibición reduce el movimiento mitocondrial entre células (Bukoreshtliev et al., 2009). Las células conectadas por TNT's pueden ser del mismo o de diferente tipo, por ejemplo, las mitocondrias de cardiomiocitos pueden transferirse a células progenitoras endoteliales (Koyanagi et al., 2005) y las neuronas pueden donar mitocondrias a los astrocitos (Wang et al., 2012). En un modelo de daño pulmonar inducido por el humo del cigarro, el movimiento de las mitocondrias mediado por

TNT's desde células madre mesenquimales (CMM) a células epiteliales de las vías respiratorias, mejoró la producción de ATP, el potencial de membrana y el consumo de oxígeno (Li et al., 2014). Así mismo, la transferencia por TNT's y sus efectos benéficos se han descrito en modelos experimentales que incluyen el daño isquémico (Liu et al., 2014), la diferenciación de células renales (Plotnikov et al., 2010) y el cáncer (Moschoi et al., 2016).

Las vesículas extracelulares (VE) comunican a las células a corta y larga distancia. En función de su tamaño se clasifican en 1) exosomas, cuyas dimensiones oscilan entre 30 y 100 nm y se originan a partir de endosomas vesiculares que se fusionan con la membrana plasmática para ser liberados y 2) microvesículas (MV), que miden entre 100 y 1000 nm y se liberan a través de la gemación hacia afuera de la membrana plasmática (Holm et al., 2018). Varios estudios han demostrado que células dañadas pueden recibir mitocondrias funcionales dentro de MV (Miliotis et al., 2019). En el SNC, los astrocitos pueden donar mitocondrias funcionales a las neuronas después de un accidente cerebrovascular, lo que permite la reparación neuronal y confiere neuroprotección (Hayakawa et al., 2016) (figura 7). Por el contrario, grupos de mitocondrias disfuncionales en las protuberancias axonales pueden ser transferidas a los astrocitos para su posterior degradación (Davis et al., 2014). En astrocitos fetales humanos, se observó la liberación de MV "gigantes" que van de 1 a 8 μm y contienen mitocondrias funcionales (Falchi et al., 2013). Además, en neuronas de *Caenorhabditis elegans* se ha observado un nuevo tipo de vesícula gigante denominada exóforo (Melentijevic et al., 2017) de la misma manera que ocurre en cardiomiocitos. En estas células se ha encontrado que la liberación de mitocondrias disfuncionales se da por medio de exóforos como parte de un sistema de limpieza celular (Nicolás-Ávila et al., 2020). Los exóforos, cuyos diámetros son de 4 μm aproximadamente, se forman alrededor del soma neuronal y contienen además de mitocondrias, proteínas agregadas y lisosomas, sugiriendo que son un mecanismo activo para la eliminación de orgánulos dañados (Melentijevic et al., 2017) (figura 7). Por último, se ha encontrado que existen mitocondrias funcionales libres en el torrente sanguíneo y en el líquido cefalorraquídeo (Al Amir Dache et al., 2020; Chou et al., 2017; Song et al., 2020), lo que abre interrogantes nuevas en la dinámica de la transferencia mitocondrial que permite la señalización entre células mediada por mitocondrias.

2.5. Trasplante mitocondrial

A pesar de los esfuerzos de la industria farmacéutica, actualmente no existe una terapia eficaz para revertir la EA. Varios compuestos han completado ensayos de fase 3 en diversas etapas de la EA y ninguno ha demostrado con certeza ralentizar el deterioro cognitivo o mejorar el funcionamiento cerebral (Congdon and Sigurdsson, 2018; Long and Holtzman, 2019; Panza et al., 2019). Lo anterior destaca la necesidad de tener diferentes enfoques para el diseño de tratamientos para la EA.

Durante algunos años, se han implementado estrategias dirigidas a las mitocondrias para revertir los efectos nocivos de la disfunción mitocondrial. La suplementación con sustratos de la CTE, como piruvato y beta-hidroxibutirato se han utilizado como terapia farmacológica para restaurar la respiración mitocondrial neuronal después de la privación de glucosa (Laird et al., 2013). Además, se han probado directamente la citocromo c y la coenzima Q10, que muestran algunos efectos benéficos para algunas enfermedades cardiovasculares y metabólicas (Pepe et al., 2007; Piel et al., 2007; Zozina et al., 2018). De la misma manera, la administración de antioxidantes también ha sido utilizada para mejorar el sistema antioxidante mitocondrial, particularmente en el cerebro de pacientes con Enfermedad de Parkinson (EP) (Jin et al., 2014). Por otro lado, las proteínas citosólicas que son propensas a la agregación se pueden importar a las mitocondrias para su degradación (Ruan et al., 2017), como se ha observado en modelos de la EA donde reducen los niveles y la toxicidad de A β (Sorrentino et al., 2017). Por lo tanto, varios grupos de investigación han estudiado los efectos positivos de mejorar la función mitocondrial de manera farmacológica o mediante la transferencia de mitocondrias sanas a células dañadas para disminuir las ERO, restaurar la producción de ATP, mantener la homeostasis de Ca²⁺, reparar el mtDNA y degradar agregados proteicos (Gollihue and Rabchevsky, 2017; Shin et al., 2017).

El trasplante mitocondrial es una estrategia que se ha empleado para mejorar las funciones celulares en varios modelos de enfermedades humanas. Inicialmente, se describió la captación de mitocondrias aisladas en células de carcinoma (Clark and Shay, 1982). Posteriormente, la co-incubación de células con mitocondrias xenogénicas aisladas de células

murinas a células humanas carentes de mitocondrias, resultó en la incorporación de mitocondrias y el restablecimiento de la energía aeróbica (Katrangi et al., 2007). Otras estrategias de trasplante *in vitro* han utilizado péptidos de penetración celular como Pep-1, el cual se une a las mitocondrias y produce poros en la membrana celular para facilitar la entrada mitocondrial (Morris et al., 2001). Las mitocondrias exógenas acopladas a Pep-1 se han utilizado en modelos celulares de la EP para restaurar la función mitocondrial y reducir la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra (Chang et al., 2016). Además, un estudio reciente mostró que las mitocondrias acopladas a Pep-1 pueden incorporarse en células híbridas (células que pueden incorporar mitocondrias de sujetos humanos y perpetuar sus componentes codificados por ADNmt) que poseen una mutación asociada con el síndrome MELAS (encefalopatía mitocondrial con acidosis láctica y episodios similares a accidentes cerebrovasculares), lo que resulta en la recuperación de la respiración celular (Chang et al., 2017). Más aún, la eficiencia del trasplante mitocondrial se ha demostrado en trasplantes de mitocondrias que son absorbidas de manera eficiente por las células PC-12 (Gollihue et al., 2017) y recientemente, el potencial antitumoral del trasplante mitocondrial ha mostrado resultados prometedores en las células de cáncer de mama (Chang et al., 2019), así como efectos en la desaceleración del crecimiento tumoral y mayor supervivencia en un modelo de cáncer de pulmón (Fu et al., 2019).

Las primeras observaciones de los beneficios del trasplante mitocondrial *in vivo* se realizaron en modelos animales de isquemia miocárdica, donde la inyección de mitocondrias aisladas del músculo cardíaco de animales sanos condujo a una recuperación sustancial en la producción de ATP con una reducción en el tamaño del área de infarto. De manera interesante, observaron que los trasplantes de mitocondrias congeladas no produjeron efectos benéficos en la restauración cardíaca, lo que demuestra que las mitocondrias deben ser funcionales para los efectos positivos del trasplante (McCully et al., 2009).

Posteriormente, se reportó que los trasplantes de mitocondrias autólogas obtenidas del músculo pectoral mayor de conejos, al inyectarse en su corazón isquémico antes de la reperfusión, produce una mejora de los parámetros mecánicos asociada con la presencia de las mitocondrias trasplantadas en cardiomiocitos, dos horas posterior al trasplante

(Masuzawa et al., 2013). Igualmente, se informó este mismo enfoque en cerdos utilizando mitocondrias marcadas con partículas de óxido de hierro en un modelo de isquemia, resultando en la incorporación de las mitocondrias y la mejora de la función cardíaca (Kaza et al., 2017). El trasplante mitocondrial también se ha probado en corazones de ratas diabéticas dando como resultado una función miocárdica mejorada post-isquémica y una lesión celular disminuida (Doulamis et al., 2019).

Además de los efectos beneficiosos de las mitocondrias inyectadas directamente en el corazón isquémico, la administración sistémica a través de la vasculatura ha mostrado resultados similares. En este sentido, se han suministrado mitocondrias aisladas de fibroblastos a través de la arteria coronaria en conejos sometidos a un protocolo de isquemia, y se ha demostrado su incorporación en cardiomiocitos y en los espacios intersticiales (Cowan et al., 2016). También, la administración intracoronaria de mitocondrias sanas aumentó el flujo sanguíneo asociado con la producción de ATP y la activación de los canales KIR en corazones de cerdo (Shin et al., 2019).

Debido a que el trasplante mitocondrial ha mostrado resultados benéficos en modelos animales, se han realizado algunos estudios preliminares en humanos. La primera aplicación clínica del trasplante mitocondrial se realizó en pacientes pediátricos con lesión por isquemia cardíaca a los que se les trasplantaron mitocondrias autólogas aisladas del músculo recto del abdomen. Después de ello, los pacientes tuvieron una mejora significativa en su función sistólica, lo que permitió la retirada del soporte de oxigenación por membrana extracorpórea en el segundo día del trasplante mitocondrial (Emani et al., 2017). Más recientemente, se ha documentado que el trasplante de mitocondrias prolonga el tiempo de conservación por congelación para el trasplante de corazón, por lo que este procedimiento también podría utilizarse como herramienta para mejorar los resultados del trasplante de órganos (Moskowitzova et al., 2018).

2.6. Trasplante mitocondrial en el sistema nervioso

La mayor parte de las investigaciones sobre el trasplante de mitocondrias se ha realizado en modelos celulares, animales y pacientes con daño cardíaco con la finalidad de revertir el daño inducido por la isquemia (Emani and McCully, 2018). No obstante, el posible uso de esta estrategia para el tratamiento de enfermedades del SNC ha sido probado recientemente en diferentes paradigmas experimentales.

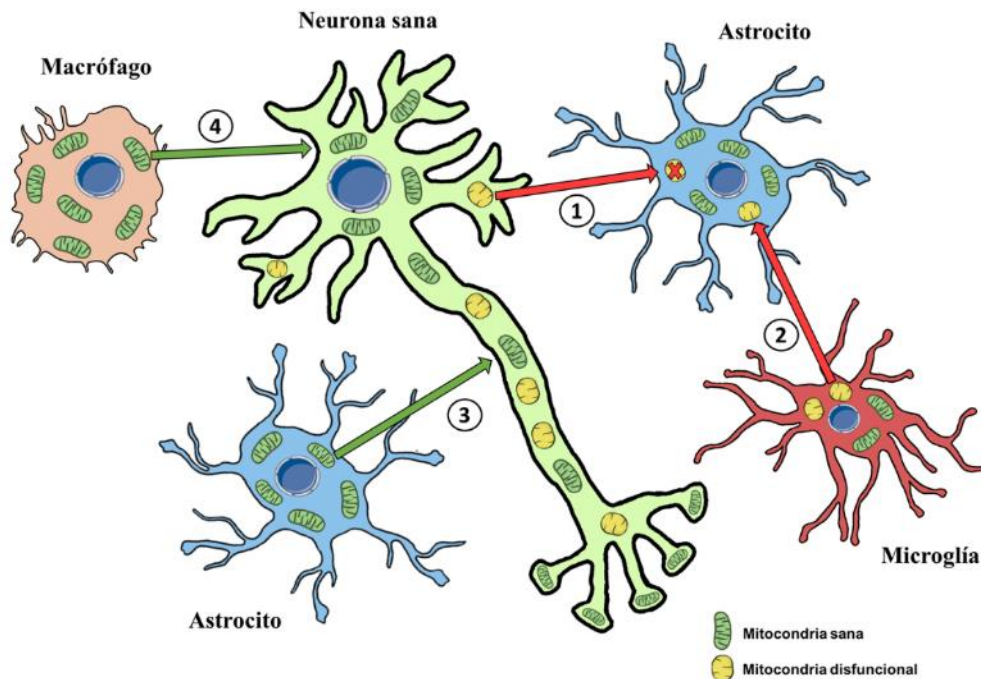


Figura 8. Transferencia mitocondrial en el sistema nervioso. 1) Neurona a astrocito: Degradación de las mitocondrias de células ganglionares de la retina por los astrocitos. 2) Microglía a astrocito: Inducción de la respuesta astrocítica A1 y propagación de la neurodegeneración inflamatoria. 3) Astrocito a neurona: Neuroprotección y señales de supervivencia celular. 4) Macrófago a neurona: resolución del dolor inflamatorio y recuperación de la fosforilación oxidativa en neuronas sensoriales.

Como ya se mencionó, en el nervio óptico de la rata, las neuronas podrían concentrar mitocondrias disfuncionales en protuberancias axonales que son capturadas por astrocitos adyacentes para su degradación (Davis et al., 2014). Además de que los astrocitos suministran mitocondrias a las neuronas sometidas a privación de glucosa y oxígeno para revertir el daño bioenergético *in vitro* e *in vivo* (Hayakawa et al., 2016). También las neuronas de *C. elegans* tienen la capacidad de liberar mitocondrias dañadas dentro de exóforos (Melentijevic et al., 2017). Recientemente, se ha informado que mitocondrias fragmentadas

liberadas por la microglía desencadenan la respuesta astrocítica (Joshi et al., 2019), y se demostró un mecanismo por el cual los macrófagos pueden transferir mitocondrias a neuronas sensoriales para resolver el dolor inflamatorio (Van Der Vlist et al., 2020) (Figura 8).

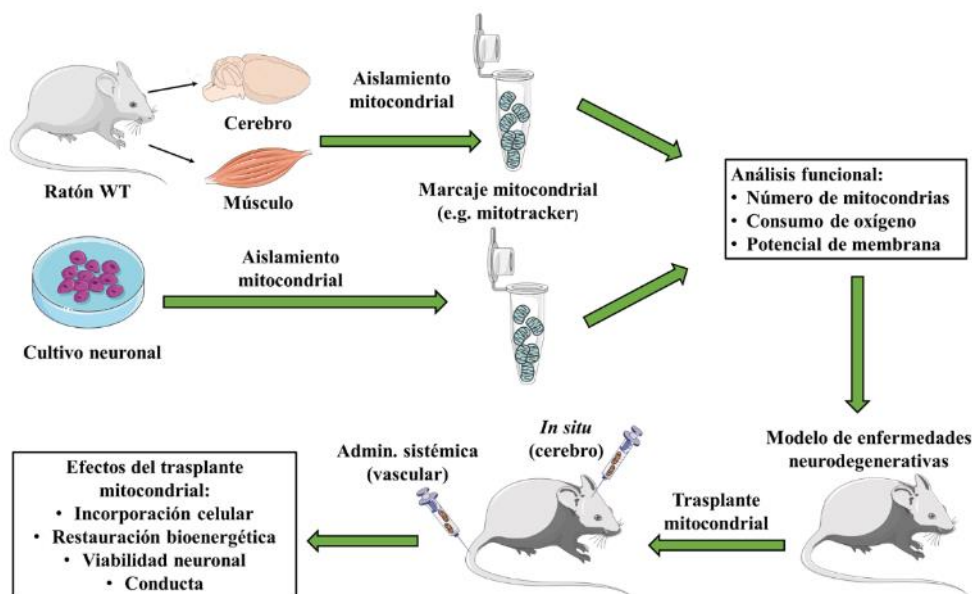


Figura 9. Trasplante mitocondrial para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. El trasplante de mitocondrias es una estrategia terapéutica simple que consta de tres pasos principales: aislamiento de mitocondrias activas; suministro de mitocondrias al cerebro y captación celular de mitocondrias exógenas (modificado de Espino De La Fuente-Muñoz and Arias, 2021).

A partir de estas observaciones y los avances en el estudio del trasplante mitocondrial en otros órganos, se han desarrollado diversas estrategias de aislamiento y suministro de mitocondrias para el SNC (figura 9). En relación con ello, se conoce que las mitocondrias xenogénicas obtenidas de líneas celulares e inyectadas de manera local o sistémica, son capaces de restaurar las habilidades motoras de ratas con isquemia cerebral posterior a la captura de estas mitocondrias en neuronas y astrocitos (Huang et al., 2016). Otro estudio ha investigado la viabilidad del trasplante de mitocondrias alogénicas en un modelo de la EP inducida con 6-hidroxidopamina (6-OHDA). En este caso, se demostró la mejora de la función mitocondrial en neuronas de la sustancia nigra, y después de tres meses se logró una recuperación del rendimiento motor en los animales tratados (Chang et al., 2016). Trabajos similares han encontrado que en modelos de la EP inducidos por 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), la administración sistemática de mitocondrias favorece la

actividad motora, disminuye las ERO, restaura los niveles de ATP y la actividad del complejo I mitocondrial (Shi et al., 2017). Interesantemente, también se identificaron mitocondrias trasplantadas en varios tejidos además del cerebro, incluidos el hígado, el corazón y los riñones.

Por otro lado, se han inyectado mitocondrias obtenidas de cultivos celulares o mitocondrias autólogas del músculo en la médula espinal dañada de ratas. Estas mitocondrias, se localizaron en células microgliales y en motoneuronas de la médula espinal, produciendo un efecto neuroprotector a corto plazo (Gollihue et al., 2018, 2017). Otros trabajos han demostrado que las mitocondrias trasplantadas a los nervios ciáticos lesionados mejoraron las propiedades de conducción nerviosa y el comportamiento animal (Kuo et al., 2017). En un modelo *in vitro* de privación de oxígeno y glucosa, se informó que los medios condicionados derivados de células progenitoras contienen mitocondrias funcionales que se incorporan de manera eficiente en las células endoteliales del cerebro, lo que conduce a una mejora de la permeabilidad y promueve la angiogénesis, así como un aumento en los niveles de ATP, mtDNA, la proteína TOM40 (Hayakawa et al., 2018) y reduce el volumen del área de infarto en modelos isquémicos (Liu et al., 2019). Además, el trasplante de mitocondrias autólogas aisladas del músculo pectoral mayor infundidas en los ventrículos laterales, redujo el estrés oxidante, atenuó la astrogliosis, promovió la neurogénesis después de un accidente cerebrovascular (Zhang et al., 2019) y redujo la apoptosis así como la fuga de la barrera hematoencefálica (BHE) (Zhang et al., 2020). Recientemente, se observó que el trasplante mitocondrial de las CMM a neuronas corticales aumento la supervivencia neuronal y mejoró el metabolismo después la exposición a peróxido de hidrógeno (Tseng et al., 2020). Además, las mitocondrias aisladas de hígados de ratones jóvenes y trasplantadas a ratones viejos dieron como resultado la reducción de ERO, aumento en los niveles de ATP y mejoró el rendimiento motor y cognitivo en ratones viejos (Zhao et al., 2020).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La disfunción mitocondrial es un evento temprano en la EA y puede ser causa del daño sináptico observado en los pacientes y en modelos de este padecimiento. Sin embargo, no se ha demostrado si el envejecimiento se asocia con disfunción mitocondrial sináptica o si la expresión anormal de moléculas como el A β y la tau son causa de una disfunción mitocondrial adicional directamente en la sinapsis.

Tampoco se ha valorado la posibilidad de utilizar el trasplante mitocondrial en neuronas para mejorar su función bioenergética, ni las condiciones apropiadas para llevar a cabo este trasplante a fin de prevenir o revertir el daño sináptico que ocurre en la EA.

4. HIPÓTESIS

La acumulación de A β y tau afecta la dinámica y bioenergética mitocondrial que conlleva al déficit sináptico durante el envejecimiento y el desarrollo de la EA, por lo que la transferencia y el trasplante de mitocondrias mejorará la función mitocondrial en neuronas y en un modelo *in vivo* de la EA.

5. OBJETIVOS

Analizar el papel de A β y tau en la dinámica y bioenergética mitocondrial y desarrollar un modelo de transferencia y trasplante mitocondrial *in vitro* y en el hipocampo de ratones 3xTg-AD.

5.1 Objetivos particulares

- Analizar el consumo de oxígeno y el potencial de membrana mitocondrial en terminales sinápticas de diferentes regiones cerebrales del ratón 3xTg-AD.
- Analizar la acumulación de A β y tau en terminales sinápticas del ratón 3xTg-AD.
- Evaluar los niveles de las proteínas de la dinámica mitocondrial: Drp1, p-Drp1(Ser616) y Mfn1 en terminales sinápticas del ratón 3xTg-AD.
- Aislar mitocondrias cerebrales y evaluar su incorporación a neuronas corticales.
- Evaluar la actividad metabólica y la bioenergética mitocondrial en cultivos primarios de neuronas corticales.
- Trasplantar mitocondrias cerebrales en un modelo *in vivo* y evaluar su incorporación en neuronas.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

Disfunción mitocondrial en terminales sinápticas del ratón 3xTg-AD

6.1.1 Modelo Triple Transgénico de la Enfermedad de Alzheimer (3xTg-AD).

Se utilizaron ratones hembra 3xTg-AD (Oddo et al., 2003) así como ratones WT (B6129SF2/J) de dos rangos de edad: jóvenes (de entre 2 y 3 meses) y animales de mediana edad (9 a 11 meses), en la que presentan niveles significativos de los marcadores de la EA, así como deterioro cognitivo (Belfiore et al., 2019). Los animales fueron manipulados con todas las precauciones necesarias para evitar el sufrimiento de acuerdo con los lineamientos de la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM (protocolo aprobado 1287). Los ratones se alojaron en cajas de acrílico en ciclos de 12 horas luz/oscuridad a 22° C con agua y comida *ad libitum*.

La genotipificación de los ratones se realizó a partir de una porción de 2 mm de cola de cada animal. Las colas fueron maceradas en 75 µL de reactivo de lisis alcalina (NaOH 1 N, EDTA 50 mM) y se incubaron a 95° C durante 1 hora en baño de agua. Posteriormente se agregaron 75 µL de reactivo de neutralización (Tris HCl 40 mM, pH 7.5) y se mezcló con vortex. Las muestras se centrifugaron a 12,500 r.p.m. durante 2 minutos a 4° C, se obtuvo el sobrenadante y se almacenó en congelación para PCR. Los primers utilizados para APP-tau fueron: 5tauRev (5'-TCCAAAGTTCACCTGATAGT-3'), APP interna (5'-GCTTGCACCAGTTCTGGATGG-3'), y Thy12.4 (5'-GAGGTATTTCAGTCATGTGCT-3'). Para la amplificación de PS1, se utilizó PS1-K13 (5'-CACACGCACACTCTGACATGCACAGGC-3') y PS1-K15 (5'-AGGCAGGAAGATCACGTGTTCCAAGTAC-3'). Cada reacción de PCR contenía 3 µL de DNA, 2.5 µL de Coral Load, 0.5 µL de dNTP's 10 mM, 1.5 µL de la mezcla de primers, 0.125 µL de Taq DNA polimerasa y 20.37 µL de agua para un volumen final de 28 µL. Se realizaron 24 ciclos de amplificación a 94° C para desnaturalización durante 30 segundos, 53° C por 30 segundos para alineación, 72° C por 30 segundos para extensión y por último una extensión final a 72° C durante 3 minutos. En el caso de PS1 se realizó una digestión del

DNA durante 2 horas a 37° C. La reacción de digestión contenía 20 µL de producto de PCR más 3.33 µL de Buffer NEB, 0.4 µL de la enzima BSTII y 9.6 µL de agua para un volumen final de 33.33 µL. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio.

6.1.2. Obtención de sinaptosomas

La purificación sinaptosomas se realizó mediante el método descrito anteriormente (Löscher et al., 1985) modificado para ratón. Los ratones se sacrificaron por decapitación y se disectaron la corteza frontal, el hipocampo y el cerebelo para homogeneizarlos en 1 mL de solución de sacarosa 0.32 M. Una vez homogeneizados, se centrifugaron a 4,500 r.p.m. y los sobrenadantes se colocaron sobre 1 mL de sacarosa 1.2 M y se centrifugaron a 50,000 r.p.m. durante 20 minutos. La interfase formada (fracción sinaptosomal) se separó y se llevó a un volumen de 2 mL con sacarosa 0.32 M. Posteriormente, se colocó sobre 1 mL de sacarosa 0.8 M y se centrifugó a 50,000 r.p.m. durante 20 minutos. Por último, el sedimento se resuspendió en 1 mL de buffer de Locke (NaCl 154 mM, KCl 5.6 mM, CaCl₂ 2.3 mM, MgCl 1 mM, NaHCO₃ 3.6 mM, glucosa 5mM, HEPES 5 mM, pH 7.4). Con este método, los sinaptosomas aislados del cerebelo corresponden a la fracción denominada "sinaptosomas pequeños" que provienen principalmente de contactos sinápticos de células granulares (Ferrari et al., 2015; Israël and Whittaker, 1965). Todo el proceso se llevó a cabo a 4° C en una ultracentrífuga Beckman Coulter (Optima XPN-90) con un rotor de titanio de ángulo fijo 90Ti

6.1.3. Consumo de oxígeno y potencial de membrana mitocondrial de sinaptosomas

El consumo de oxígeno de las mitocondrias sinápticas se midió utilizando un oxímetro Strathkelvin 782 (Warner/Strathkelvin Instruments) con un electrodo tipo Clark sumergido en una cámara de 1 ml con un baño PolyScience (Modelo 9000, Niles, Il). Los sinaptosomas se resuspendieron en 700 µL de buffer de respiración (Trehalosa 100 mM, KH₂PO₄ 10 mM, HEPES 10 mM, EGTA 1 mM, MgCl₂ 1,3 mM, Na₂SO₄ 1,2 mM, NaCl 54 mM, 1 mg/ml de BSA, pH 7,2). Posteriormente, se diluyeron 75 µL de solución de sinaptosomas (≈ 70 µg de

proteína) con 75 μ L del tampón de respiración para un volumen final de 150 μ L. El consumo de oxígeno se midió por duplicado durante 20 minutos en tres condiciones diferentes: Respiración basal agregando glucosa 10 mM, la respiración en presencia del desacoplante carbonilo-4-(trifluorometoxi) fenilhidrazona (FCCP) 1 μ M y en presencia del inhibidor de la ATPasa, Oligomicina 6.6 μ M. Se analizaron las pendientes de consumo de oxígeno y se calcularon los nanomoles de oxígeno consumidos por minuto por mg de proteína (nmol O₂/minuto/mg de proteína). Todas las mediciones se realizaron a 37° C.

El potencial de membrana mitocondrial se determinó mediante el cambio de fluorescencia de safranina O a una longitud de onda 495/586 nm (em-ex) en un lector Sinergy HTX. Todos los experimentos se realizaron en placas de 96 pozos. En cada pozo, se agregaron 75 μ L de buffer de respiración (Trehalosa 100 mM, KH₂PO₄ 10 mM, HEPES 10 mM, EGTA 1 mM, MgCl₂ 1.3 mM, Na₂SO₄ 1.2 mM, NaCl 54mM y BSA 1mg/mL) adicionado con safranina 1 μ M y se incubó durante 10 minutos a 37° C. Posteriormente se agregaron 75 μ L de sinaptosomas y se dejaron incubar durante 15 minutos a 37° C. Finalmente se agregó FCCP 1 μ M y se dejó incubando a la misma temperatura durante 40 minutos. El valor del potencial de membrana mitocondrial se obtuvo restando la fluorescencia después de abatir el potencial con FCCP. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

6.1.4. Análisis de las proteínas de fusión y fisión mitocondrial

Para determinar los niveles de proteínas mitocondriales de las terminales sinápticas, éstas fueron homogeneizadas en buffer de lisis Ripa y se cuantificó la proteína total usando el kit DC Protein Assay (Bio-Rad) empleando BSA como curva patrón. Se cargaron 20 μ g de proteína sinaptosomal en gel de acrilamida SDS-PAGE al 10% y se corrió una electroforesis a 30 mA durante 1: 30 horas. Posterior a la electroforesis, las proteínas fueron transferidas en membranas PVDF (Bio-Rad) a 4° C y 250 mA durante dos horas. Después de la transferencia, las membranas fueron lavadas 3 veces durante 10 minutos con PBS-Tween20 0.1% y se bloquearán con BSA 5% durante dos horas a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron con anticuerpos para Drp1 (1:1000, Abcam) p-Drp1 (Ser 616) (1:500, Cell Signaling) y Mfn1 (1:1000, Abcam) toda la noche a 4° C. Después de tres

lavados con PBS-Tween20 durante 10 minutos, las membranas se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano generados contra IgG de ratón (1:15000, Santa Cruz Biotechnology) o conejo (1:12000, Santa Cruz Biotechnology) por 2 horas a temperatura ambiente. Las membranas fueron reveladas usando el Kit químico luminiscente Immobilon Western (Millipore) y placas fotográficas Kodak X-Omat. El análisis densitométrico se realizó utilizando los valores obtenidos para Drp1 total o la tinción de membrana con Ponceau y fueron analizados con el software ImageJ.

6.1.5. Análisis por microscopía electrónica

La solución de sinaptosomas se centrifugó a 10,000 r.p.m. durante 10 minutos. El pellet formado se fijó durante 30 minutos en glutaraldehído al 3%, pH 7.4. Las muestras se deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol (30%-100%) a 4° C. Posteriormente, se incubaron en resina hidrofílica L.R. White y se polimerizaron a 40° C, para realizar cortes de 70-80 nanómetros en un ultramicrotomo Ultracut Reichert Jung. Los cortes fueron depositados en rejillas de níquel recubiertas con collodion.

Para analizar la presencia y localización de A β y tau en las terminales sinápticas, se realizó un marcaje con inmuno-oro. Las rejillas con los cortes fueron lavadas con agua destilada e incubadas sobre una gota de BSA 5%/PBS/suero de caballo 0.3% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las rejillas se incubaron sobre una gota de anticuerpo primario contra A β 1-42 (1:50, Millipore) o tau-46 (1:50, Cell Signaling) toda la noche a 4° C. Las gradillas se lavaron 3 veces por goteo con PBS y se incubaron en PBS/BSA 5% durante 15 minutos. Las secciones fueron incubadas con el anticuerpo secundario acoplado a oro (1:30, 12 nm, Abcam) durante una hora a temperatura ambiente. Enseguida las gradillas fueron lavadas con PBS y agua destilada y contrastadas con acetato de uranilo y se observaron en un microscopio electrónico de transmisión JEOL 1200 EX-II.

Transferencia y trasplante mitocondrial

6.2.1 Cultivos neuronales

Se obtuvieron cultivos primarios de corteza cerebral a partir de embriones de ratones CD-1 en los días 15 a 17 de gestación. Se realizó la disección de las cortezas cerebrales de los embriones en solución Krebs y se realizó una disociación mecánica del tejido, así como una digestión enzimática con 2 mg de tripsina durante 5 minutos a 37° C. Inmediatamente, se agregó solución Krebs con 5.2 mg de inhibidor de tripsina y 0.8 mg de DNAsa1 para parar la reacción y digerir el DNA. Posteriormente se centrifugó a 1,000 r.p.m. durante 1 minuto y la solución se pasó a través de un tamiz de nylon de 40 µm de diámetro para obtener una suspensión celular homogénea, la cual se centrifugó a 1,000 r.p.m durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante, y las células se resuspendieron en medio de cultivo Neurobasal suplementado con 1% de B27, 0.15 mM de L-Glutamina y 20 µm/mL de penicilina/estreptomicina. El conteo celular se realizó en cámara de Neubauer y las neuronas se sembraron en cajas de 60 mm³ a una densidad de 6 millones de células por caja previamente tratadas con poli-L-lisina (10 µm/mL en PBS estéril) e incubadas a 37° C. Las células se mantuvieron en el mismo medio de cultivo por 7 días in vitro (DIV) a 37° C en una atmósfera húmeda con 5% CO₂/95% aire. Al DIV 2 se agregó 1 µm de ara-C para detener la proliferación de células no neuronales.

6.2.2. Aislamiento mitocondrial

El aislamiento de mitocondrias se realizó con base en lo reportado previamente (Preble et al., 2014), modificado para cerebro. Se disectó la corteza frontal de ratones CD-1 de 3 meses de edad, la cual fue homogeneizada en 5 mL buffer de aislamiento (sacarosa 300 mM, K-HEPES 10 mM y K-EGTA 1 mM, 5 mg de BSA, pH 7,4). El homogenado se centrifugo a 4,500 r.p.m durante 10 minutos y se obtuvo el sobrenadante al cual se le agregó 1 mg de subtilisina A, se incubó durante 10 minutos a 4° C y se centrifugó a 4,000 r.p.m durante 4 minutos. El sobrenadante se pasó dos veces por un tamiz de nylon de 40 µm y enseguida por uno de 10 µm de diámetro. La solución filtrada se separó en 6 tubos de microcentrífuga y se centrifugaron a 9,000 g durante 10 minutos. Posteriormente, los pellets que corresponden a la fracción mitocondrial se juntaron y homogeneizaron en 200 µl de buffer de respiración (250 mM, 2 mM KH₂PO₄, 10 mM MgCl₂, 20 mM HEPES y 0,5 mM de EGTA, pH 7.2). Para

el aislamiento mitocondrial se utilizó una centrifuga refrigerada Eppendorf (5804 R) con un rotor oscilante (A-4-81) y uno de ángulo fijo (FA-45-30-11).

6.2.3. Consumo de oxígeno de mitocondrias aisladas

Se utilizó un oxímetro Strathkelvin modelo 782 (Warner/Strathkelvin Instruments) con un electrodo tipo Clark inmerso en una cámara de 200 μ L a una temperatura de 37° C con un baño PolyScience. Se agregaron 170 μ L de buffer de respiración (Sacarosa 250 mM, KH₂PO₄ 2mM, MgCl₂ 10mM, HEPES 20mM, EGTA 05.mM pH 7.2), y se agregaron 30 μ g de mitocondrias. Posteriormente se añadió consecutivamente Piruvato/Malato 10 mM, ADP 100 μ M y Cianuro 1 μ M con la finalidad de calcular el control respiratorio induciendo los estados III y IV de la mitocondria. El potencial de membrana mitocondrial se determinó mediante el cambio de fluorescencia de Safranina O 10 μ M, después de abatir el potencial de membrana con FCCP 1 μ M, a una longitud de onda 495/586 nm (em-ex) a 37° C, empleando un O₂k-fluororespirómetro (Oroboros Instruments).

6.2.4. Transferencia mitocondrial *in vitro*

Para los ensayos de transferencia mitocondrial *in vitro*, se emplearon cultivos primarios de corteza cerebral disectadas de embriones de ratones CD-1 en el día 15 a 17 de gestación. Se sembraron 1 millón de células y a los 7 DIV las mitocondrias de los cultivos fueron marcadas con 100 nm de Mitotracker-Green durante 30 minutos a 37 °C. Las mitocondrias extraídas de la corteza cerebral de ratones de 2 meses fueron marcadas con 100 nm de Mitotracker-Red desde la homogeneización del tejido. Una vez que se purificaron, algunas mitocondrias fueron incubadas con un péptido de penetración celular (Pep1, 0.06 mg), durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, al cultivo se le agregaron 20 μ g de mitocondrias exógenas marcadas con Mitotracker-Red 100 nm y se realizó una grabación durante 2 horas bajo condiciones estándar de cultivo en un microscopio confocal Nikon AR1+STORM. Una vez terminada la grabación, se realizó la tinción con calceina-AM 1 μ M y proyecciones en Z de máxima intensidad para determinar la viabilidad y la internalización de las mitocondrias.

6.2.5. Infusión hipocampal de mitocondrias

El trasplante mitocondrial se realizó mediante cirugía estereotáxica en ratones C57BL/6 de 3 meses. Los ratones fueron anestesiados con una mezcla de 1-2% de isoflurano y carbógeno (O₂ 95%/C₀₂ 5%). Una vez colocados en el aparato estereotáxico, se expuso el cráneo para ubicar las coordenadas correspondientes al área dorsal del hipocampo derecho: anteroposterior -2, mediolateral -1.4 y dorsoventral -1.9 en relación con bregma. Las coordenadas se basaron en el atlas del cerebro de ratón de Paxinos y Watson. Después de la trepanación, se infundieron 100 nL de suspensión de mitocondrias corticales marcadas con Mitotracker-Red, en un periodo de 30 minutos. Después de 24 horas de la infusión, se les realizó la prueba de campo abierto para evaluar la actividad motora y ansiedad.

6.2.6. Inmunofluorescencia

Cultivo celular: Las células se fijaron con 600 µl de paraformaldehido (PFA) al 1% durante 5 minutos sobre escarcha. Posteriormente, se realizaron 3 lavados en agitación con PBS/Triton X-100 0.3% durante 5 minutos. Las células se permeabilizaron con PBS /Triton X-100 0.3% por 10 minutos a temperatura ambiente. Una vez realizada la permeabilización, las muestras se bloquearon con PBS/Triton X-100 0.3% y BSA al 0.5% a 4° C durante toda la noche. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo primario disuelto en solución de bloqueo toda la noche a 4° C (Tuj1 1:500). Transcurrido ese tiempo, se realizaron 2 lavados en agitación durante 3 minutos con PBS/Triton X-100 0.3% y se incubó con el anticuerpo secundario (Alexa Fluor 488 1:700) durante 2 horas a temperatura ambiente. Inmediatamente, se realizaron 2 lavados de 3 minutos con PBS/Tritón x-100 0.3% y se agregó Hoechst (1:1000) como marcador nuclear y se incubó durante 15 minutos. Finalmente se realizaron 2 lavados de 5 minutos y se montaron en cubreobjetos para su observación en microscopio confocal. En el caso de las muestras que se tiñeron con Mitotracker, solo se realizó la fijación de la muestra.

Modelo animal: Después de la infusión de mitocondrias y las pruebas de memoria, a los ratones se les administró una sobredosis intraperitoneal de pentobarbital sódico (210 mg/kg)

y se llevó a cabo una perfusión transcardíaca con solución salina (0.9% NaCl) y PFA al 4% disuelto en Buffer de fosfatos (PB) 0.1 M fríos. Los cerebros se extrajeron y se mantuvieron en PFA 4% durante 48 horas. Posteriormente, se deshidrataron en gradientes de sacarosa de 15 y 30% en PB por 48 horas cada uno y finalmente se obtuvieron secciones coronales de 40 μm con un criostato MicromTM HM550 (Thermo Fisher Scientific). Las secciones se mantuvieron en una solución de crioprotección (25% de glicerol, 25% de etilenglicol y 50% de PB 0.2 M, pH 7.4) a 4 °C para su posterior procesamiento.

Los cortes coronales del cerebro se procesaron manteniendo el tejido en flotación con PB 0.1 M. Inicialmente, se permeabilizaron con PB 0.1 M/Triton X-100 0.3% durante 30 minutos para después bloquearlos con PB 0.1 M/Tritón X-100 0.3%/BSA 5% toda la noche a 4° C. Posteriormente, las secciones se incubaron con los anticuerpos primarios de interés: Tau-46 (1:500) y VDAC (1:500) durante 24 horas a 4 °C. A continuación, las secciones se lavaron tres veces durante 5 minutos con PB 0.1 M/Tritón X-11 0.3% para posteriormente incubarlas durante 2 horas con anticuerpos secundarios fluorescentes (Alexa Fluor 488, 1:700). Los núcleos celulares se tiñeron con Hoechst (1:1000). Finalmente, las secciones se lavaron con PB 0.1 M/Tritón X-11 0.3% tres veces durante 5 minutos y se colocaron en portaobjetos y se cubrieron con medio de montaje. Las muestras se observaron en un microscopio confocal Nikon AR1+STORM.

6.2.7. Evaluación de la capacidad redox mitocondrial

La viabilidad celular se evaluó mediante la conversión de bromuro de 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5-difenil-tetrazolio (MTT) en cristales de formazán (Mosmann, 1983). La reducción de MTT es un indicador de la capacidad redox mitocondrial que se utiliza como medida de la viabilidad celular. En resumen, se agregó MTT en PBS (5 mg/mL) a las neuronas corticales durante 1 hora a 37 °C en una proporción 1:10 (v/v). Al final del período de incubación, se eliminó el medio y se solubilizaron los cristales de formazán con una solución de alcohol isopropílico acidificado (HCl 0,04 N). La absorbancia de cada muestra se cuantificó utilizando un espectrofotómetro a 570 nm.

6.2.8. Pruebas conductuales

Campo Abierto: Después de 24 horas de la infusión hipocampal de mitocondrias se evaluó la actividad motora espontánea y la ansiedad de los individuos. Para ello se utilizó una caja de acrílico de 80x80x30 cm dividida en 16 cuadrantes iguales. Para esta prueba los ratones se colocaron en el centro de la caja y se les permitió desplazarse libremente durante 5 minutos. La actividad de los ratones se grabó para su análisis y se cuantificó el número de cruces totales y de cruces hacia el centro o hacia los cuadrantes laterales de la caja.

6.2.9. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como el error estándar de la media (\pm SEM). Las comparaciones entre grupos se realizaron utilizando la prueba t de Student o ANOVA seguido de la prueba de Tukey, como se indica en la leyenda de cada figura. Los valores de $p < 0,05$, $p < 0,01$ o $p < 0,001$ se consideraron significativos y se utilizó el software GraphPad Prism 5.01 (San Diego, CA, EE. UU.) para la realización de las gráficas y el análisis estadístico.

7. RESULTADOS

Parte 1. Déficit mitocondrial en el modelo 3xTg-AD

7.1.1. Alteraciones bioenergéticas asociadas con la edad en mitocondrias sinápticas

Para evaluar la función mitocondrial en terminales sinápticas a diferentes edades y de animales 3xTgAD, se cuantificó la tasa de respiración mitocondrial, midiendo el consumo de oxígeno basal en presencia de glucosa y después de la exposición a oligomicina (inhibidor de la ATP sintasa) y a FCCP (desacoplante de la fosforilación oxidativa).

En la corteza cerebral, las mitocondrias sinápticas sanas de ratones WT jóvenes consumieron 8.0 nmolO₂/min/mg basales, así como 5.3 y 12.8 después del tratamiento con oligomicina o FCCP respectivamente, muy similar al observado en ratones 3xTg-AD jóvenes. Sin embargo, los sinaptosomas de ratones WT viejos mostraron tasas de consumo de oxígeno significativamente reducidas en las tres condiciones probadas (3,5, 2,1 y 4, nmolO₂/min/mg respectivamente) en comparación con los sinaptosomas WT jóvenes. Además, se observó una reducción significativa en los sinaptosomas de los ratones 3xTg-AD viejos en comparación con los de los ratones WT de la misma edad (2.5, 1.62 y 3.3 nmolO₂/min/mg respectivamente). Las mitocondrias sinápticas del hipocampo presentaron un patrón de consumo de oxígeno similar al observado en las mitocondrias sinápticas de la corteza cerebral: en animales jóvenes, el consumo de oxígeno fue similar entre los ratones (9,8, 6,7 y 13 nmolO₂/min/mg en WT frente a 8,0, 6,7 y 12,9 nmolO₂/min/mg en 3xTg-AD) (figura 10). En todas las condiciones probadas, se observó una reducción importante en la respiración de las mitocondrias sinápticas de los ratones WT envejecidos en comparación con las de los ratones WT jóvenes, y este fenotipo se exacerbó aún más en los sinaptosomas obtenidos de los animales 3xTg-AD viejos (4.4, 3.5 y 7.1 nmolO₂/min/mg en los WT en comparación con 3.0, 1.6 y 5.1 nmolO₂/min/mg en los 3xTg-AD) (figura 10, A-C). Por otro lado, las mitocondrias de sinaptosomas del cerebelo de animales jóvenes mostraron respuestas similares, pero se observó una reducción notable en la función de las mitocondrias sinápticas de los ratones WT viejos, y no se observó alguna reducción adicional en los ratones 3xTg-

AD viejos. En el caso de las mitocondrias de la corteza cerebral y el hipocampo, se observó que las mitocondrias permanecen acopladas, mientras que las mitocondrias sinápticas del cerebelo parecían desacoplarse en la vejez independientemente de la condición transgénica.

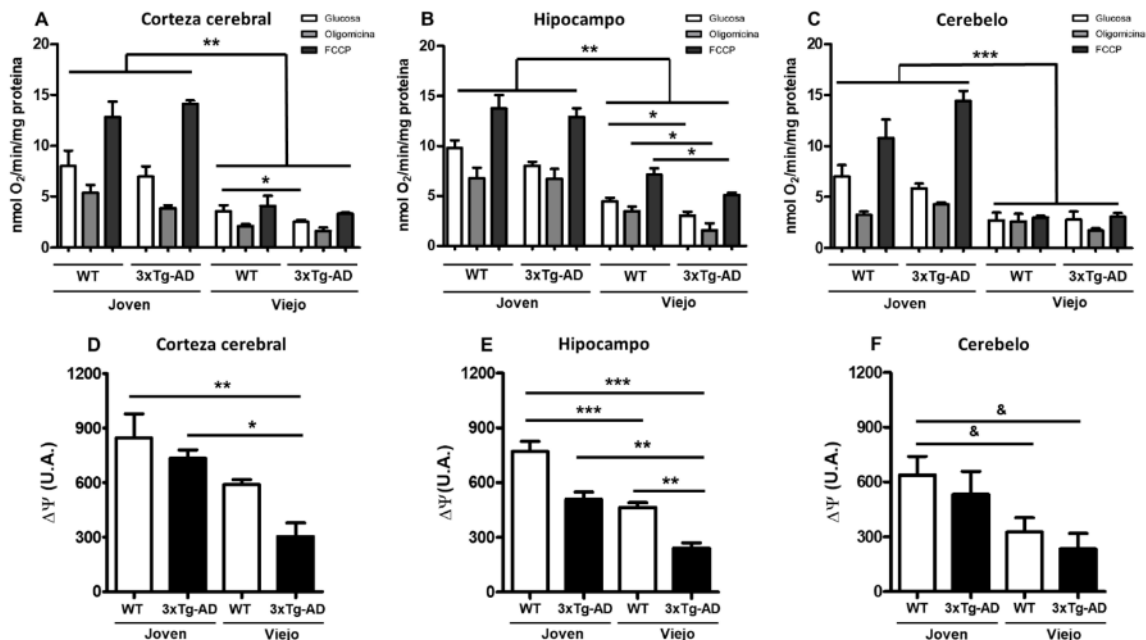


Figura 10. Análisis del consumo de oxígeno y el potencial de membrana mitocondrial en relación con la edad. La bioenergética mitocondrial se midió en sinaptosomas aislados de ratones hembra 3xTg-AD y WT jóvenes (2-3 meses) y viejos. (9-11 meses) La tasa de consumo de oxígeno de sinaptosomas corticales (A), hipocámpales (B) y cerebelares (C) se midió en presencia de glucosa 10 mM (barra blanca), oligomocina 6 μM (barra gris) o FCCP 1 μM (barra negra). Los valores se expresan como nmolO₂/min/mg de proteína, n=3 por cada grupo analizado. El potencial de membrana mitocondrial se midió mediante el cambio de fluorescencia de Safranina O en sinaptosomas de corteza (D), hipocampo (E) y cerebelo (F) Las mediciones se realizaron por triplicado (n =3-4 animales por grupo). ANOVA y prueba de comparación múltiple de Tukey, * p <0.05; ** p <0,01; *** p <0,001. Prueba t de Student, & p <0,05.

Además, se midió el potencial de la membrana mitocondrial utilizando Safranina O. Los resultados obtenidos indican que existe una reducción significativa de este parámetro en los sinaptosomas de animales WT viejos en la corteza cerebral y el hipocampo (30% y 40%, respectivamente), reducción que fue más notable en animales 3xTg-AD viejos que en animales jóvenes 3xTg-AD lo que sugiere una producción comprometida de ATP en los sinaptosomas de animales viejos. De manera similar al consumo de oxígeno, el potencial de membrana de las mitocondrias sinápticas del cerebelo disminuyó con el envejecimiento, y no se observó ninguna reducción adicional en ratones 3xTg-AD viejos (figura 10, D-F). Lo anterior demuestra que existe una disminución en la bioenergética de las mitocondrias sinápticas que se asocia con el envejecimiento cerebral y se exagera en el modelo transgénico de la EA.

7.1.2. Cambios en la dinámica mitocondrial en sinaptosomas de ratones 3xTg-AD

Como la despolarización de la membrana mitocondrial interrumpe el equilibrio entre la fusión y la fisión mitocondrial (Kleele et al., 2021), medimos el contenido de las proteínas que están involucradas en estos procesos: los niveles de la forma activa de Drp1 (p-Drp1 ser616) para evaluar la fisión mitocondrial, y los correspondientes a la proteína de fusión Mfn1. Observamos un ligero aumento en los niveles de p-Drp1 en los sinaptosomas aislados de ratones viejos, en comparación con los sinaptosomas obtenidos de ratones jóvenes, tanto en preparaciones de corteza cerebral como de hipocampo, y el aumento fue estadísticamente significativo en los sinaptosomas de ratones 3xTg-AD envejecidos, en ambas regiones (80% y 70%, respectivamente) (figura 11, A y B).

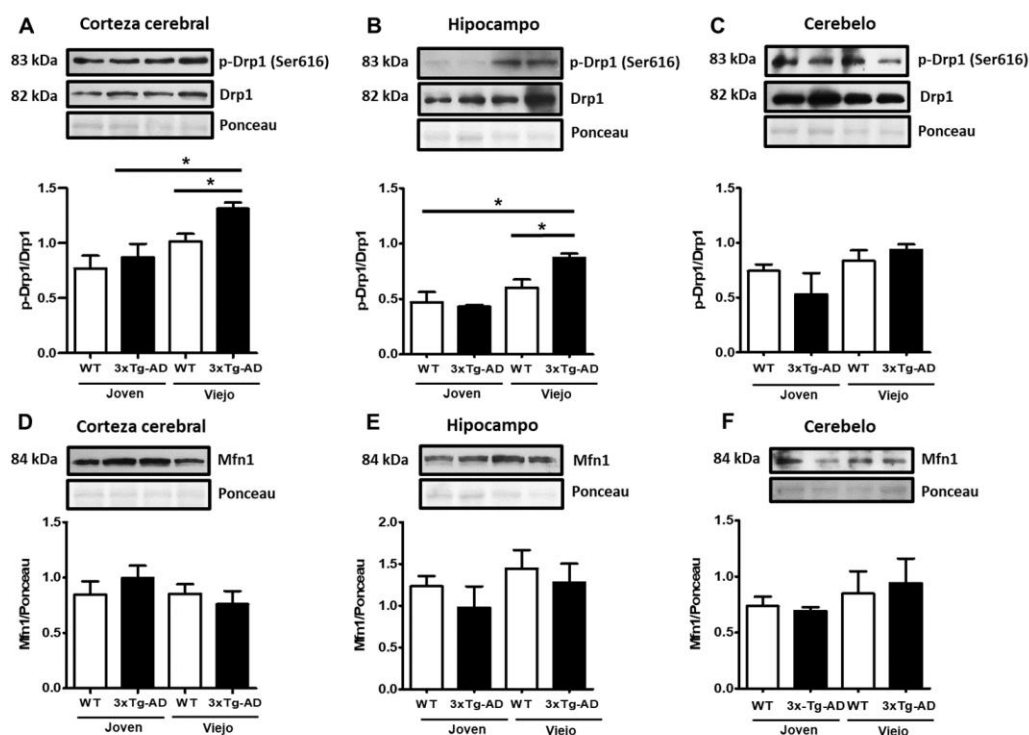


Figura 11. Cambios en las proteínas de fusión y fisión mitocondrial. Western blot representativo y análisis densitométrico de Drp1 y p-Drp1 ser616 en sinaptosomas corticales (A), hipocámpales (B) y cerebelares (C). Se muestran los contenidos de Mfn1 en muestras corticales (D), hipocámpales (E) y cerebelares (F). Las barras representan el análisis densitométrico de proteínas normalizadas con Drp1 total o Ponceau (n= 3-4 por cada grupo). Prueba t de Student * p <0,05.

De la misma manera, analizamos si la proteína Mfn1, encargada de dirigir la fusión mitocondrial, se ve afectada por el envejecimiento. Los experimentos de Western Blot indicaron la presencia de altos niveles basales de esta proteína, pero no se detectaron cambios

significativos a ninguna edad en ninguno de los dos fenotipos (figura 11, D y E). En el caso particular de los sinaptosomas aislados del cerebelo, no se encontraron cambios en las proteínas en ninguno de los grupos analizados (figura 11, C y F), comprobando que, en regiones vulnerables en la EA, existe un desbalance en la dinámica mitocondrial, donde se incrementa la fisión de las mitocondrias sinápticas.

7.1.3. Acumulación de A β y tau en mitocondrias sinápticas

Debido a que las mitocondrias tienen la capacidad de importar proteínas agregadas o mal plegadas (Ruan et al., 2017), decidimos analizar la presencia de A β y tau, así como los posibles cambios morfológicos en las mitocondrias sinápticas en el hipocampo de ratones 3xTg-AD, la región más afectada en las primeras etapas de la EA. La figura 12 muestra imágenes representativas de microscopía electrónica de sinaptosomas obtenidos del hipocampo de ratones WT y 3xTg-AD viejos, así como sus cuantificaciones. Como se observa, los sinaptosomas de ratones 3xTg-AD exhibieron diámetros sinápticos y mitocondriales más grandes que los de ratones WT. Estos cambios se pueden observar claramente en los gráficos correspondientes (figura 12, E-G).

Posteriormente evaluamos si los sinaptosomas de ratones 3xTg-AD acumulan A β y tau en la vejez utilizando el marcaje de estas proteínas con inmuno-oro. Con base en las imágenes analizadas, observamos una acumulación significativa de partículas de oro unidas al péptido A β localizadas principalmente dentro de las mitocondrias sinápticas (2-3 partículas de oro por cada sinaptosoma), en contraste con los ratones WT en los que no se observó la presencia de A β (figura 13). De manera interesante, se observó la presencia de tau en animales WT (~1 partículas de oro por sinaptosoma), mientras que los animales 3xTg-AD presentaron una acumulación evidente de la proteína en los sinaptosomas (2-3 partículas de oro) y en menor medida dentro de las mitocondrias sinápticas (alrededor de 1-2 partículas de oro) (figura 13, G y H). En conjunto, los análisis ultraestructurales de los sinaptosomas indican que A β y tau pueden ser internalizadas en las mitocondrias sinápticas del hipocampo en los 3xT-AD envejecidos.

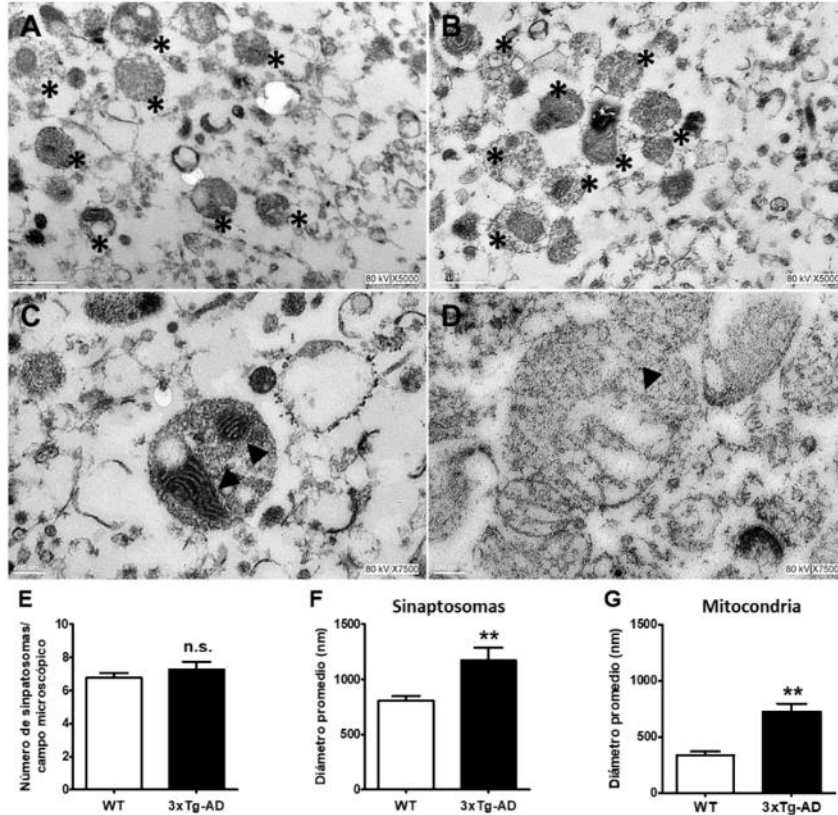


Figura 12. Cambios ultraestructurales en los sinaptosomas hipocámpales de ratones 3xTg-AD viejos (9-11 meses). Imágenes representativas de microscopía electrónica de sinaptosomas (*) de ratones WT (A) y 3xTg-AD (B). Se representan los cambios en el tamaño sináptico y el tamaño mitocondrial en ratones WT (C) y 3xTg-AD (D). Las mitocondrias están marcadas con puntas de flecha (n=3-4 secciones aleatorias de cada condición experimental de 3 experimentos independientes). Número de sinaptosomas (E), diámetro de sinaptosomas (F) y diámetro mitocondrial (G). Prueba t de Student, ** p < 0,01

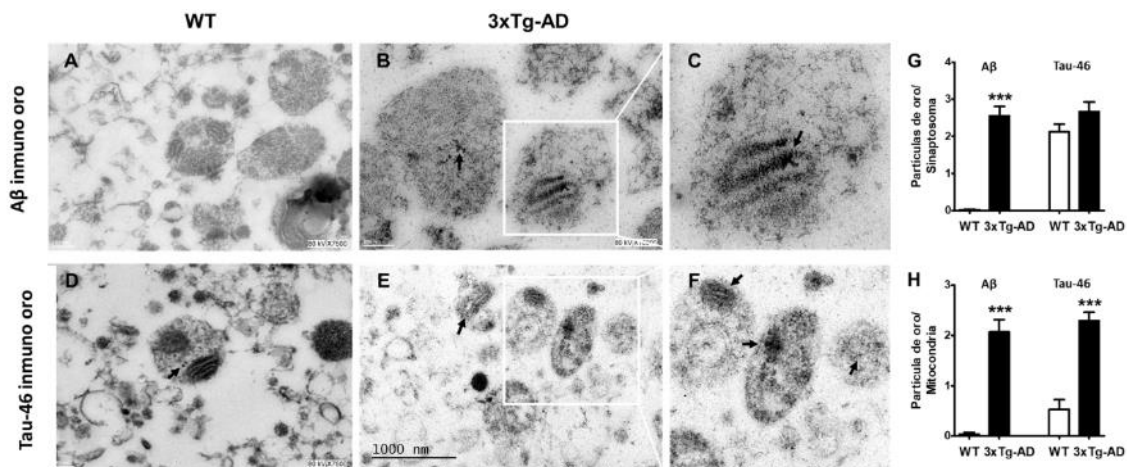


Figura 13. Acumulación de Aβ y tau en sinaptosomas de ratones WT y 3xTg-AD viejos (9-11 meses). Imágenes representativas de microscopía electrónica con anticuerpos acoplados a oro (12 nm) para Aβ y tau que demuestran su acumulación (flechas negras). Sinaptosomas del hipocampo de ratones WT (A, D) y 3xTg-AD (B, E). C y F son ampliaciones de B y E respectivamente. Cuantificación de partículas de oro (G, H). Prueba t de Student, *** p < 0,001.

Parte 2. Transferencia y trasplante mitocondrial

7.2.1. Cultivos primarios de neuronas corticales

Para determinar si las mitocondrias neuronales aisladas pueden incorporarse a otras neuronas, se estandarizaron cultivos primarios de corteza cerebral. En la figura 14 se muestran imágenes representativas de inmunofluorescencias de los cultivos a los 8 DIV.

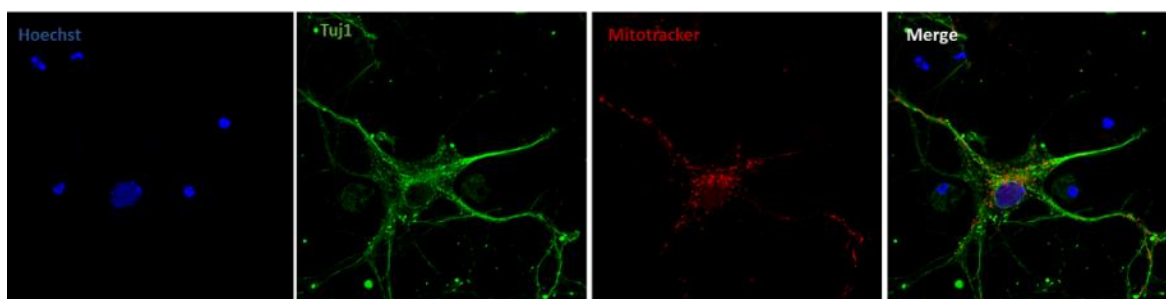


Figura 14. Cultivos primarios de neuronas corticales. Imágenes representativas de los cultivos de neuronas corticales 8 DIV que muestran el marcaje mitocondrial con Mitotracker-Red (rojo), Beta III Tubulina (verde) y Hoechst (azul).

7.2.2. Extracción y purificación de mitocondrias corticales

Para la extracción mitocondrial se probaron distintos protocolos a partir de la disección de la corteza cerebral. Como se observa en el Western Blot (figura 15, A), el protocolo más eficiente para la purificación de mitocondrias fue mediante filtración diferencial y digestión enzimática, el cual se ha utilizado previamente para el aislamiento rápido de mitocondrias en estrategias de trasplante mitocondrial (Preble et al., 2014). En la fracción purificada por este método se observa un enriquecimiento de la proteína Mfn1 empleada como marcador mitocondrial, así como la ausencia de sinaptofisina (marcador de sinapsis) y calreticulina (marcador de retículo endoplásmico). Además, se observó tinción positiva para el marcador fluorescente Mitotracker-Red (figura 15, C), comprobando que las mitocondrias aisladas conservan su potencial de membrana.

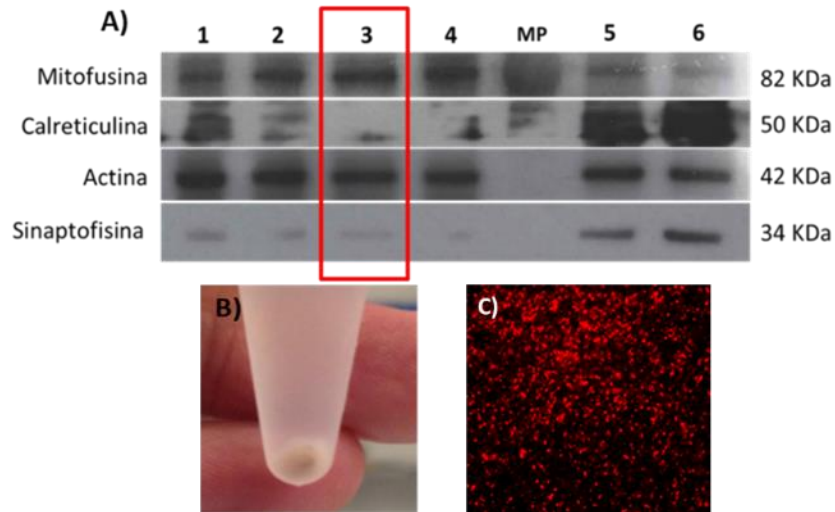


Figura 15. Aislamiento de mitocondrias corticales. A) Western Blot representativo donde se midieron las proteínas mitofusinal (mitocondria), calreticulina (retículo endoplásmico) actina (citoesqueleto) y sinaptofisina (vesículas presinápticas). 1 y 2 = protocolo de extracción con sacarosa, 3 = extracción por filtración y digestión enzimática, 4 = extracción utilizando un protocolo de obtención de sinaptosomas por gradiente de sacarosa, 5 y 6 = homogenado total de corteza cerebral, MP = marcador de peso molecular. B) Pellet de la fracción mitocondrial obtenida de corteza cerebral. C) Tinción con Mitotracker-Red de la fracción mitocondrial utilizando el protocolo de filtración y digestión enzimática.

Para determinar si las mitocondrias purificadas se mantenían acopladas, se determinó el control respiratorio, que consiste en inducir el estado III y el estado IV y calcular el cociente entre ambos. Determinamos que las mitocondrias extraídas de la corteza cerebral se mantienen acopladas hasta las primeras 3 horas después de la extracción, acoplamiento que disminuye con el tiempo. A las 6 horas se observa menor acoplamiento mientras que a las 24 horas desaparece (figura 16, A y B).

También se realizó la cuantificación del potencial de membrana mitocondrial tiñendo a las mitocondrias con Safranina O y midiendo la fluorescencia del compuesto antes y después de abatir el potencial de membrana con FCCP. Los resultados mostraron que las mitocondrias extraídas mantienen su potencial de membrana las primeras tres horas, lo que concuerda con el control respiratorio. Sin embargo, el potencial de membrana se pierde a partir de las 12 horas (figura 16, C). Estos datos en su conjunto indican que las mitocondrias son funcionales las primeras 3 horas después de su extracción y deben ser transferidas o trasplantadas en los experimentos *in vitro* e *in vivo*, en esa ventana temporal.

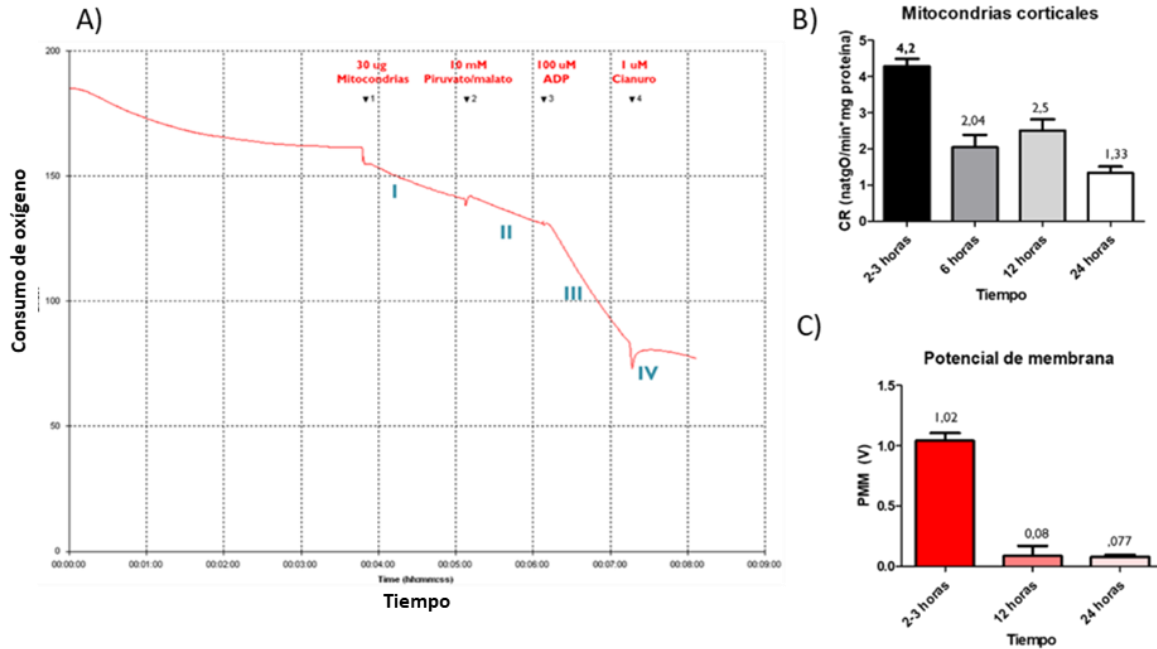


Figura 16. Estado bioenergético de las mitocondrias después de su extracción. A) Trazo representativo del consumo de oxígeno obtenido a partir de las mitocondrias aisladas por métodos de filtración y digestión enzimática. Se adicionaron 30 µg de suspensión de mitocondrias, 10 mM de piruvato/malato, 100 µM de ADP y 1 µM de cianuro. B) Control respiratorio a lo largo del tiempo después de la extracción mitocondrial. C) Potencial de membrana mitocondrial posterior a la extracción de las mitocondrias (n= 4).

7.2.3. Transferencia mitocondrial *in vitro*

Para determinar si las mitocondrias aisladas son capaces de incorporarse a neuronas, se incubaron cultivos de neuronas corticales (7 DIV) en presencia de mitocondrias aisladas (20 µg). Después de 40 y 90 minutos de incubación, las muestras fueron fijadas y analizadas mediante microscopía confocal. Las mitocondrias endógenas de los cultivos corticales se marcaron con Mitotracker-Green 100 nm 30 minutos antes de la incubación, mientras que las mitocondrias aisladas (exógenas) fueron marcadas con Mitotracker-Red 100 nm al momento de su extracción. En la figura 17 se observa que al tiempo cero las mitocondrias exógenas (rojas) permanecen en el medio de cultivo y son claramente distinguibles de las mitocondrias endógenas (verdes). Después de 40 minutos de incubación, las mitocondrias exógenas aparecen cercanas a los cuerpos neuronales, en algunos casos haciendo contacto con la membrana de las células en el área del soma y algunos axones. Después de 90 minutos de incubación, se observa una co-localización de ambos marcadores fluorescentes, sugiriendo la incorporación de las mitocondrias exógenas a las neuronas corticales.

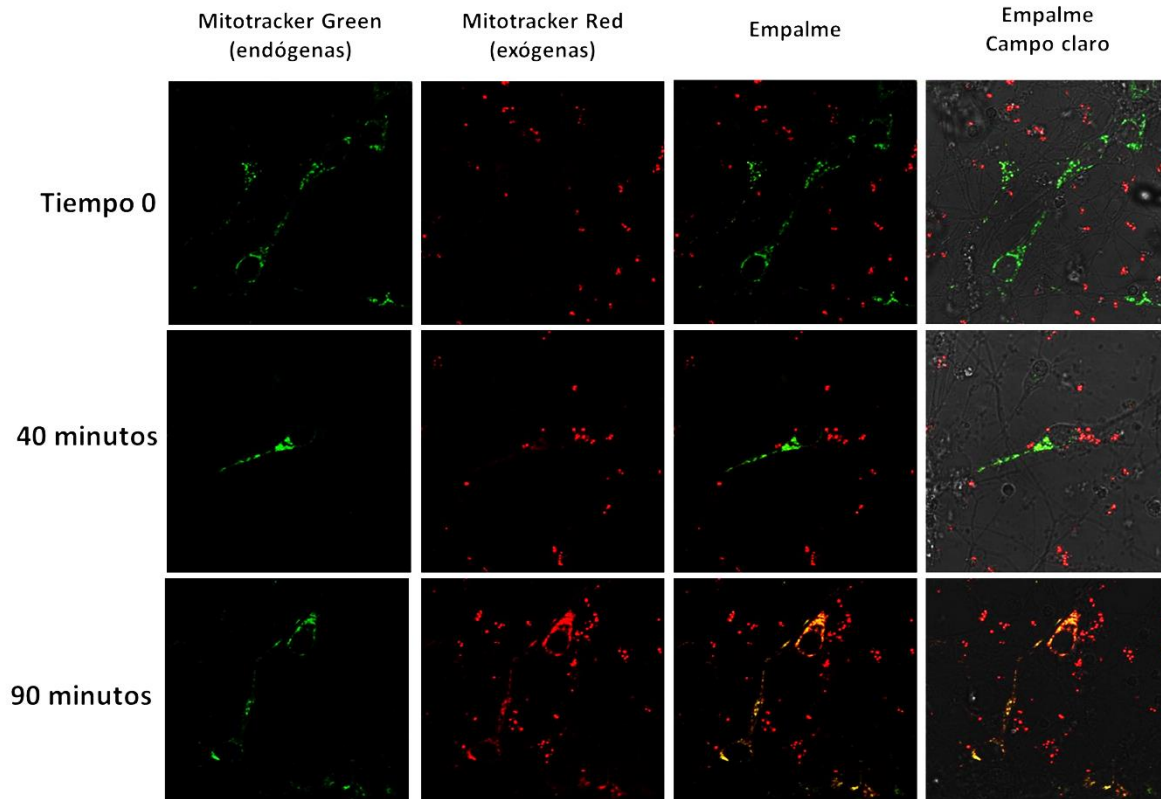


Figura 17. Curso temporal del proceso de transferencia mitocondrial *in vitro*. Las mitocondrias exógenas marcadas con Mitotracker-Red 100 nm fueron incubadas durante 90 minutos en cultivos primarios de neuronas corticales (1 millón de células por caja). Las mitocondrias endógenas fueron etiquetadas con Mitotracker-Green 100 nm. Se muestran los canales por separado y su empalme con campo claro.

Una vez que se tuvieron indicios de la incorporación de las mitocondrias, se realizaron grabaciones en tiempo real (por 2 horas) para analizar la cinética de incorporación y su posible fusión con la red mitocondrial endógena (material multimedia no mostrado). Al analizar los videos comprobamos que alrededor de los 30 minutos de incubación, las mitocondrias exógenas comienzan a aproximarse a las neuronas y a partir de los 60 minutos se puede distinguir en algunos campos la incorporación activa de mitocondrias, principalmente por los procesos de las neuronas.

Para examinar con más detalle el fenómeno de incorporación, se realizaron reconstrucciones en Z de máxima intensidad. Como se observa en la figura 18, después de 2 horas de incubación la internalización de las mitocondrias ya se ha llevado a cabo en algunas neuronas del cultivo. La visualización ortogonal de los campos analizados muestra que las mitocondrias exógenas se han incorporado a las neuronas corticales (figura 18, B). Sin

embargo, este fenómeno no se presenta en todas las neuronas o no con la misma eficiencia en todo el cultivo. Lo anterior es evidente en la figura 18, donde se observa que neuronas que se encuentran contiguas presentan marcas fluorescentes distintas.

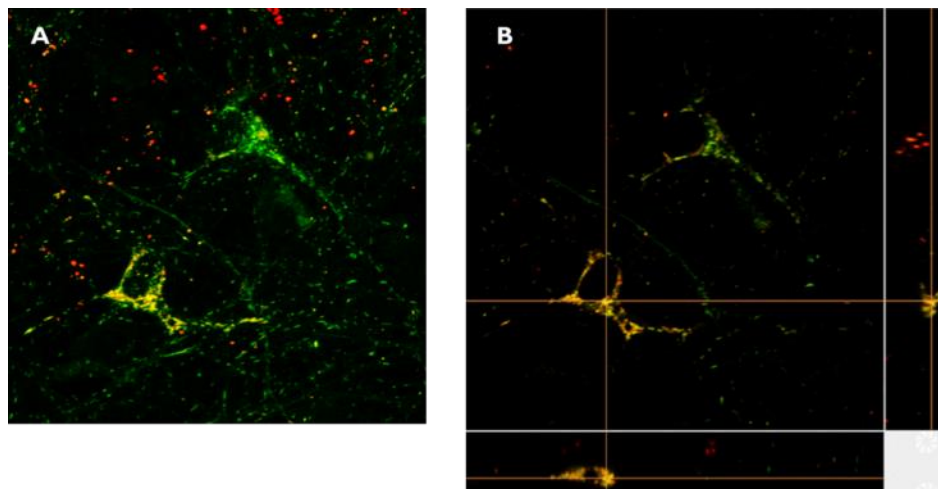


Figura 18. Transferencia mitocondrial *in vitro* después de 2 horas de incubación. A) Reconstrucción de la proyección en Z de máxima intensidad de 123 planos focales. B) Ortogonales de la reconstrucción de las imágenes en A. Las mitocondrias exógenas se encuentran marcadas con Mitotracker-Red 100 nm y las endógenas con Mitotracker-Green 100 nm. Mientras que la neurona en la parte inferior tiene un alto grado de incorporación mitocondrial (determinada por la co-localización de ambas marcas de Mitotracker, en color amarillo), la neurona de la parte superior presenta poca incorporación, haciendo distinguible las dos poblaciones mitocondriales dentro de la célula.

Por otro lado, se ha informado que el acoplamiento de péptidos de penetración a las mitocondrias aisladas pueden favorecer su incorporación a células diana (Chang et al., 2017, 2016; Morris et al., 2001). Con base en ello, investigamos si el acoplamiento de Pep1 a las mitocondrias corticales aisladas podría incrementar su internalización a las neuronas en cultivo. De la misma manera que las mitocondrias sin Pep1, se observó que la incorporación se presenta de manera diferencial en las neuronas del cultivo, aunque la eficiencia de incorporación aumenta. La figura 19 muestra las imágenes representativas después de la incubación cuando las mitocondrias son acopladas previamente con Pep1.

Para determinar la viabilidad de las neuronas después del periodo de co-incubación, las neuronas se tiñeron con calceína-AM 1 μ M (sin Mitotracker-Green) y se hicieron reconstrucciones en Z de los mismos planos focales (figura 20, A y B). Confirmamos que las mitocondrias exógenas se incorporaron a neuronas viables, y que el fenómeno ocurre de

manera diferencial entre células, observándose una gran cantidad de mitocondrias exógenas en el soma y en las proyecciones de las neuronas.

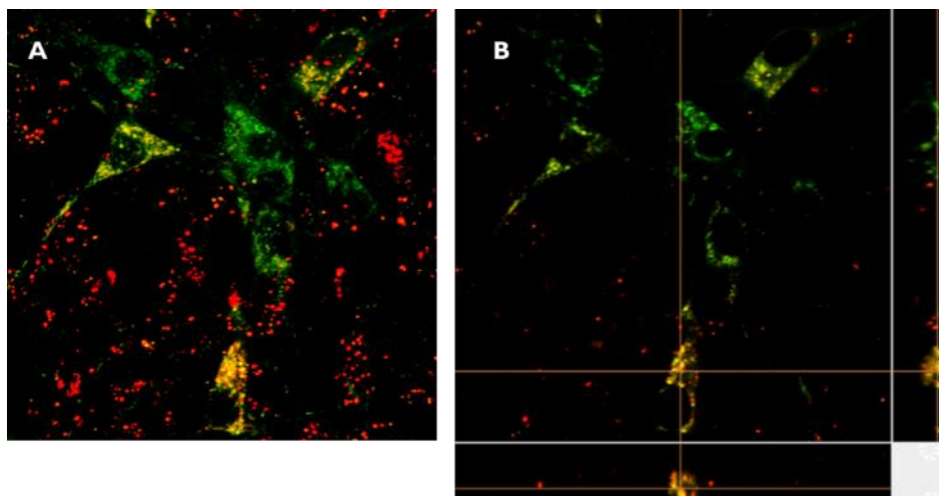


Figura 19. Transferencia mitocondrial *in vitro* después de 2 horas de incubación con mitocondrias acopladas con Pep1. A) Reconstrucción de la proyección en Z de máxima intensidad de 123 planos focales. B) Ortogonales de la reconstrucción de las imágenes en A. Las mitocondrias exógenas se encuentran marcadas con Mitotracker-Red 100 nm, mientras que las endógenas se etiquetaron con Mitotracker-Green 100 nm.

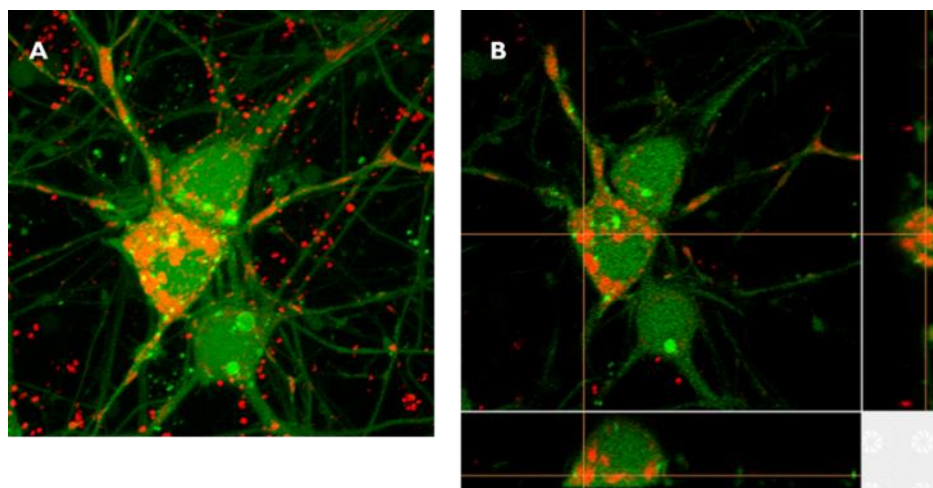


Figura 20. Transferencia mitocondrial *in vitro* después de 2 horas de incubación. A) Reconstrucción de la proyección en Z de máxima intensidad de 123 planos focales. B) Ortogonales de la reconstrucción de las imágenes en A. Las mitocondrias exógenas se encuentran marcadas con Mitotracker-Red 100 nm, Las neuronas se tiñeron con 1 μ M de calceína-AM para determinar su viabilidad después de la incorporación mitocondrial.

Para corroborar la viabilidad a largo plazo mediante un ensayo que cuantifica la actividad oxidoreductora mitocondrial, se realizó la prueba de MTT a diferentes tiempos después del inicio de la incubación con mitocondrias exógenas (figura 21). Los resultados de estos

ensayos indicaron que a las primeras 2 horas de incubación no hay cambios en los cultivos con mitocondrias, pero si se observa una disminución en la viabilidad en los cultivos que fueron incubados con mitocondrias/Pep1. Sin embargo, esta tendencia comienza a cambiar estabilizándose ambos grupos a las 24 horas y en el caso particular de mitocondrias/Pep1 la actividad oxido reductora mitocondrial se incrementa a las 96 horas posterior a la incubación, sugiriendo que las mitocondrias internalizadas incrementan la actividad mitocondrial. Curiosamente, a este tiempo los cultivos que fueron incubados con mitocondrias sin Pep1, muestran una disminución en la reducción de MTT, muy similar a los niveles de mitocondrias/Pep1 de 2 horas. En conjunto, los datos presentados indican que la internalización de mitocondrias ocurre en neuronas corticales en cultivo, y que después de 96 horas de posteriores a su incorporación, las neuronas se mantienen viables con una mayor capacidad oxido reductora mitocondrial.

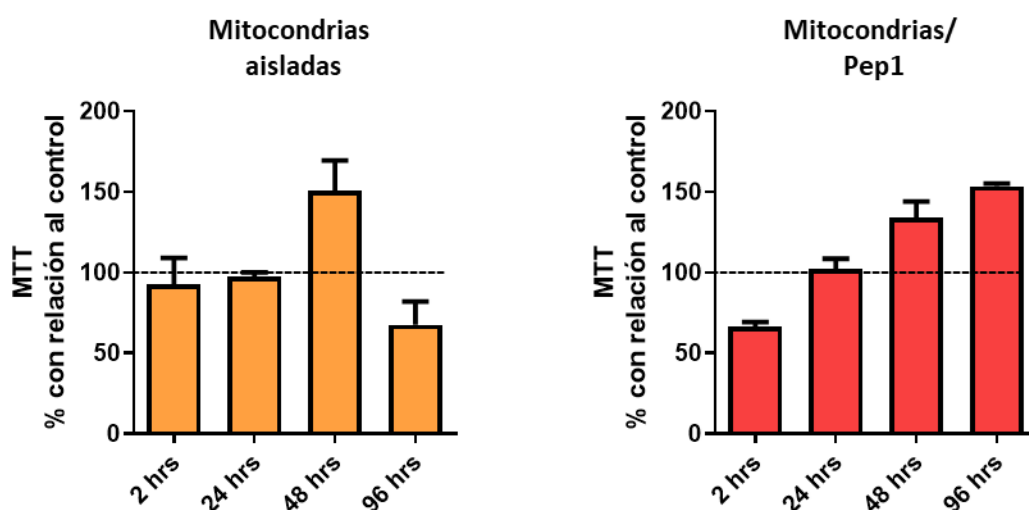


Figura 21. Curva de viabilidad celular mediante la reducción de MTT. Se representa el porcentaje de viabilidad después de la incorporación mitocondrial con y sin Pep1. La línea punteada representa el valor de 100% con respecto al promedio de los controles (buffer de respiración sin mitocondrias). Las mediciones se hicieron por triplicado, n=2.

7.2.4. Trasplante mitocondrial

Una vez que determinamos que las mitocondrias aisladas pueden internalizarse en neuronas *in vitro*, probamos infundir mitocondrias en el hipocampo de ratones C57BL/6 y determinar si las mitocondrias exógenas pueden internalizarse en algún tipo celular en el cerebro. Las mitocondrias fueron aisladas de la corteza cerebral de ratones jóvenes de dos meses y teñidas con Mitotracker-Red al momento de su extracción. Después de 24 horas de la infusión

mitocondrial, a los animales se realizaron pruebas de motricidad y ansiedad con la prueba de campo abierto y fueron sacrificados para su análisis mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal. Después de 24 horas de la infusión mitocondrial el comportamiento de los ratones no presentó cambios en comparación con el grupo control (Figura 22). Una vez que se realizó la prueba de campo abierto, se analizó si las mitocondrias exógenas se podían incorporar en el hipocampo de los ratones tratados. El análisis por microscopía confocal reveló que 24 horas después del trasplante, gran cantidad de las mitocondrias exógenas podían observarse en el tejido cerebral cerca del área de inyección. De acuerdo con las imágenes de inmunofluorescencia, las mitocondrias parecen estar internalizadas en células neuronales, como lo muestran los ortogonales de la figura 23. Si bien las mitocondrias aparecen cerca del sitio de inyección, también existe una dispersión de manera contigua en donde se sigue apreciando la captación, además, la marca visible de Mitotracker Red, indica que las mitocondrias trasplantadas conservan su potencial de membrana, por lo que siguen funcionales. Al igual que en el modelo *in vitro*, la incorporación de las mitocondrias exógenas no se observó de manera homogénea y existen neuronas que no presentan evidencia de la internalización mitocondrial. Lo anterior demuestra que, con el protocolo de aislamiento implementado, se pueden obtener mitocondrias funcionales que pueden ser ocupadas para el trasplante en tejido cerebral y que dicho trasplante no modifica la conducta exploratoria de los animales 24 horas después de la cirugía.

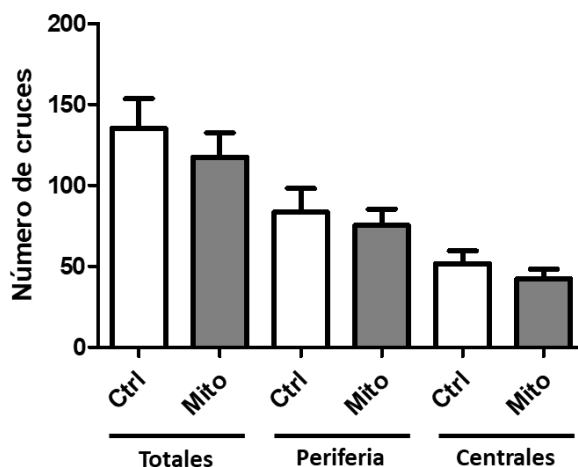
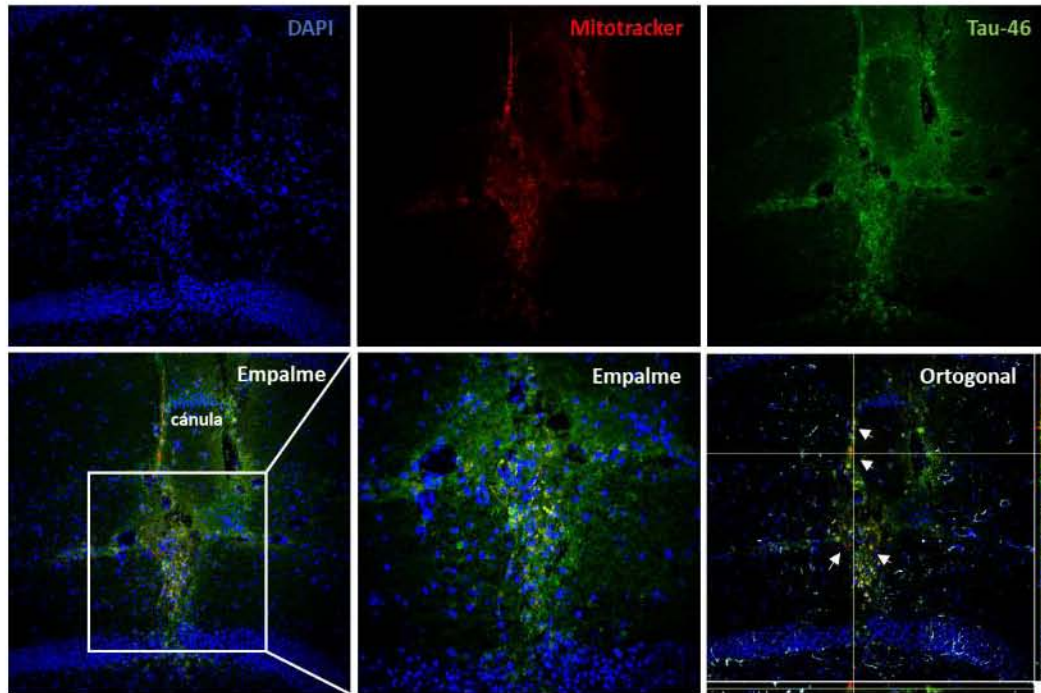


Figura 22. Prueba de campo abierto después de 24 horas de la infusión hipocampal de mitocondrias. Se representa el número de cruces totales, el número de cruces hacia los cuadrantes de la periferia y hacia el centro de la caja de prueba (n=3). No se observan cambios estadísticamente significativos entre ninguno de los grupos después de la evaluación de la conducta exploratoria.

A)



B)

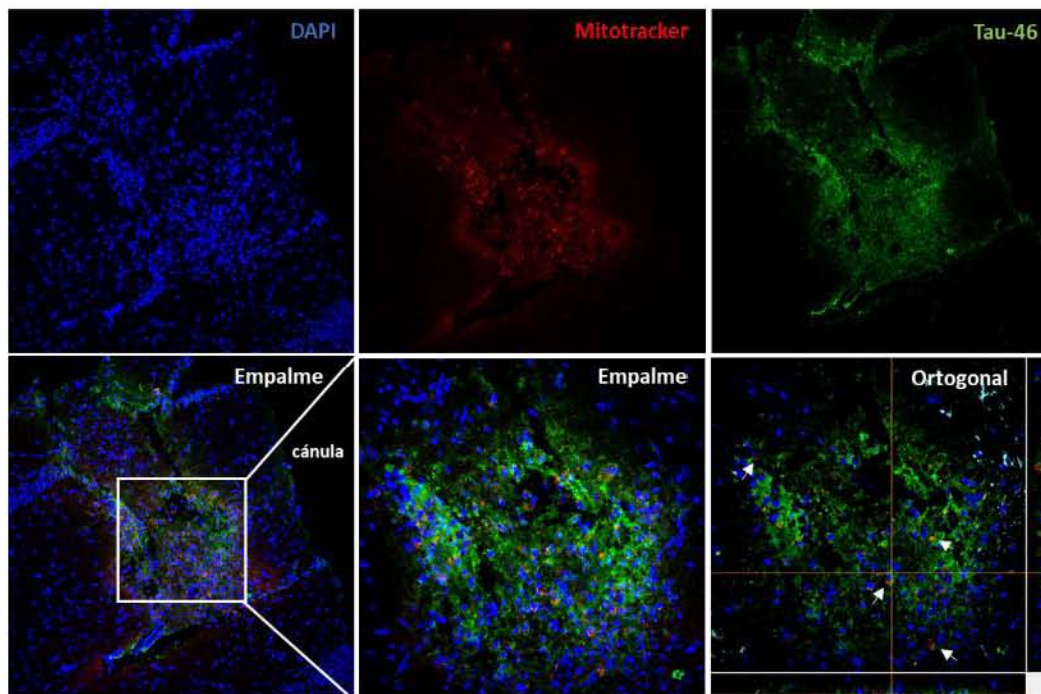


Figura 23. Localización de mitocondrias exógenas posterior al trasplante mitocondrial. Las imágenes muestran la reconstrucción de la proyección en Z de máxima intensidad, así como los ortogonales de dos ratones (A y B) en los que se puede apreciar la incorporación de mitocondrias exógenas en el hipocampo, 24 horas después de la inyección intra hipocampal de 200 μ g de mitocondrias teñidas con Mitotracker-Red 100 nm al momento de su purificación. Las flechas indican los sitios donde se observa incorporación mitocondrial en neuronas. Marcador nuclear DAPI (azul), marcador neuronal Tau.46 (verde).

8. DISCUSIÓN

Existe evidencia que sugiere que la función mitocondrial alterada es un factor importante asociado con la vulnerabilidad sináptica durante el envejecimiento (Sun et al., 2016). Sin embargo, no se comprende del todo si una disminución en el número y la calidad de las mitocondrias o si la acumulación de moléculas tóxicas dentro de las mitocondrias son los principales factores responsables de estas alteraciones. Debido a que el principal correlato con el déficit cognitivo en la EA es la pérdida sináptica (Selkoe, 2002), nos propusimos evaluar si existen alteraciones en la mitocondrias sinápticas de regiones cerebrales de importancia en la EA. Para ello, empleamos preparaciones de sinaptosomas del ratón 3xTg-AD, uno de los modelos animales más estudiados para entender los procesos que subyacen a la aparición y el desarrollo de los marcadores de la EA. Por su parte, el análisis de sinaptosomas nos permitió estudiar los procesos que ocurren en la pre-sinapsis, ya que contienen todos los componentes necesarios para almacenar y liberar neurotransmisores, contienen también mitocondrias viables y presentan un metabolismo activo después de su aislamiento (Breukel et al., 1997; Wilhelm et al., 2014).

De acuerdo con los resultados que se presentan, determinamos que la edad es el factor principal asociado con la disminución de la función mitocondrial sináptica, y que la acumulación de proteínas como tau y A β (presentes en los ratones 3xTg-AD) puede exacerbar la pérdida de la función mitocondrial en las sinapsis. Cabe señalar que el deterioro observado en la función mitocondrial sináptica en ratones WT parece ser prominente en la mediana edad (9-11 meses) y se correlaciona con lo reportado previamente como la edad en la que inicia el deterioro de la LTP (Moreno-Castilla et al., 2016) y la memoria (Gower and Lamberty, 1993), sin observarse aún pérdida significativa de marcadores presinápticos (Hong et al., 2016).

Un hallazgo importante de este trabajo fue que los sinaptosomas del cerebelo son particularmente vulnerables al proceso de envejecimiento, pero no a la neuropatología asociada con la EA, debido a que no se observó un deterioro adicional en la función mitocondrial en los animales transgénicos. Lo anterior es congruente con hallazgos previos

que demuestran que existen pocos ovillos neurofibrilares y placas amiloides en esta región, incluso en las etapas finales de la EA (Mavroudis et al., 2010; Sepulveda-Falla et al., 2014), por lo que nuestros resultados proporcionan evidencia de que la capacidad respiratoria y el control del acoplamiento mitocondrial disminuyen con el aumento de la edad independientemente de la presencia de los marcadores histopatológicos de la EA en el cerebelo. Otros estudios han demostrado que el cerebelo es muy susceptible al envejecimiento y es una de las regiones cerebrales en las que se ha descrito pérdida neuronal y densidad sináptica disminuida en ratas y seres humanos de edad avanzada (Andersen et al., 2003; Rogers et al., 1984).

Además, encontramos que en condiciones basales la capacidad respiratoria mitocondrial es similar en los sinaptosomas de animales WT jóvenes y animales transgénicos. En todos los casos y regiones analizadas, la tasa de consumo de oxígeno de las mitocondrias sinápticas se redujo consistentemente en presencia de oligomicina, y fue activado por FCCP. Estos resultados indican que en general, la función mitocondrial en los sinaptosomas es normal y que las mitocondrias permanecen acopladas. Sin embargo, en los sinaptosomas de ratones viejos se observó una disminución en la capacidad respiratoria mitocondrial lo que sugiere que la alteración de la bioenergética sináptica se asocia principalmente con el envejecimiento cerebral. En este sentido, las ERO generadas por las mitocondrias pueden tener implicaciones importantes en la disfunción bioenergética, y aunque no se evaluaron en este trabajo, es claro el papel que juegan durante el envejecimiento (Stefanatos and Sanz, 2018) y en la EA (Llanos-González et al., 2020). Otra posibilidad que se ha propuesto y que tiene apoyo experimental, es que durante el envejecimiento hay una reducción de las mitocondrias sinápticas como resultado de una alteración del transporte axonal anterógrado, una condición que se agrava en la EA debido a la desestabilización de los microtúbulos (Flannery and Trushina, 2019; Morfini et al., 2002; Stamer et al., 2002). Por lo tanto, la funcionalidad mitocondrial en la sinapsis depende no solo de la presencia de mitocondrias sanas sino también de la velocidad de transporte de estos organelos desde el cuerpo neuronal.

Por otro lado, se sabe que la dinámica mitocondrial anormal es un evento temprano relacionado con la neurodegeneración. Principalmente Drp1, la proteína que regula la fisión

de las mitocondrias, se ha asociado con la progresión de la EA (Baek et al., 2017; Cho et al., 2009; Kandimalla and Reddy, 2016; Wang et al., 2008a). De acuerdo con el análisis de Western Blot, encontramos que el envejecimiento estuvo acompañado por un aumento en la expresión de la forma activa de Drp1 (p-Drp1, Ser616) sin cambios significativos en el contenido total de la proteína. Esta activación se agravó en los sinaptosomas de los ratones 3xTg-AD. De manera interesante, se ha descrito que la fisión es un paso previo para que las mitocondrias se degraden a través de mitofagia y que una pérdida del potencial de membrana mitocondrial es una señal para el transporte retrógrado y su posterior degradación (Kleele et al., 2021; Miller, 2004), lo cual es consistente con nuestros resultados en donde existe una disminución en el potencial de membrana mitocondrial durante el envejecimiento y en los ratones 3xTg-AD.

En nuestros experimentos no determinamos el mecanismo involucrado en la activación de Drp1 durante el envejecimiento, pero se ha mostrado previamente que una de las quinasas implicadas en la fosforilación de la proteína en el residuo Ser616 es la CaMKII (Divakaruni et al., 2018; Xu et al., 2016). En este sentido y teniendo en cuenta que el envejecimiento se asocia con diversos defectos en la homeostasis del Ca^{2+} (Calvo-Rodriguez et al., 2020; Nikolettou and Tavernarakis, 2012), es posible que la sobrecarga de Ca^{2+} en la sinapsis de animales viejos pueda explicar la activación de CaMKII y en consecuencia, la fosforilación de Drp1. Además, algunos estudios han informado que la interacción de Drp1 con A β y con tau aumenta la actividad enzimática de GTPasa de Drp1 (Manczak et al., 2011; Manczak and Reddy, 2012) y en contra parte, la inhibición de Drp1 disminuye la fragmentación mitocondrial y mejora el rendimiento cognitivo en el modelo transgénico APP/PS1 de la EA (Baek et al., 2017).

También mostramos cambios morfológicos que destacan la hinchazón mitocondrial que no excluye una fragmentación mitocondrial previa. Se ha descrito que este hinchamiento genera la apertura del poro de transición mitocondrial, un aumento de la permeabilidad de iones como Ca^{2+} , la disipación del potencial de membrana mitocondrial, así como daños en la CTE y ruptura de la membrana externa, lo que disminuye la capacidad de la fosforilación oxidativa (Du and Yan, 2010; Gerencser et al., 2008), y también podría explicar el aumento de tamaño

que observamos en las mitocondrias de los ratones 3xTg-AD. En apoyo a nuestros datos, las alteraciones ultra estructurales que se reportan en este trabajo en los sinaptosomas del hipocampo de ratones 3xTg-AD, son similares a los observados en los sinaptosomas del hipocampo de rata expuestos a A β y después de la movilización interna de Ca²⁺ (Mungarro-Menchaca et al., 2002).

Por otro lado, la disfunción progresiva de las mitocondrias también puede afectar la acumulación sináptica de proteínas tóxicas, ya que las mitocondrias poseen la capacidad de importar y degradar las proteínas mal plegadas (Bender et al., 2011; Ruan et al., 2017). De esta manera, la disminución de la función mitocondrial en el envejecimiento y en la EA podría contribuir a una disminución de la proteostasis celular que exacerba la acumulación de agregados proteicos, como se encontró en las mitocondrias sinápticas de los ratones 3xTg-AD, donde evaluamos la presencia de A β y tau dentro de las mitocondrias sinápticas. Estos resultados son consistentes con las observaciones de otros grupos quienes han documentado que el A β puede localizarse en la superficie de la membrana externa de la mitocondria o en la matriz mitocondrial una vez que ha sido importado a través de TOM (Cenini et al., 2016; Hansson Petersen et al., 2008). Lo anterior cobra relevancia debido a que una vez que el A β ha sido importado, puede causar alteraciones en la fosforilación oxidativa inhibiendo el complejo IV (Atamna and Boyle, 2006; Crouch et al., 2006; Hernandez-Zimbron et al., 2012) y provocando la disminución de la actividad de la ATP sintasa (Beck et al., 2016). Finalmente, el A β también tiene efectos perjudiciales en las proteasas de la matriz mitocondrial como PreP ya que se sabe que disminuye su actividad enzimática (Alikhani et al., 2011; Mossman et al., 2014).

En años recientes se han implementado estrategias dirigidas a las mitocondrias para revertir los efectos nocivos de diferentes padecimientos, como la administración de sustratos de la cadena de transporte de electrones (Laird et al., 2013), la coenzima Q10 (Zozina et al., 2018) o la administración de antioxidantes (Jin et al., 2014). También, varios grupos han estudiado los efectos positivos de mejorar la bioenergética mitocondrial mediante la transferencia de mitocondrias funcionales en células dañadas en diversos órganos incluido el cerebro (revisado por: Espino De La Fuente-Muñoz and Arias, 2021). Por ello y en vista de que

describimos alteraciones importantes en las mitocondrias sinápticas del ratón 3xTg-AD, decidimos diseñar una estrategia de trasplante mitocondrial dirigida a células neuronales que con el objetivo de contrarrestar el daño bioenergético. Nuestros resultados demuestran que el protocolo de extracción basado en la digestión enzimática y centrifugación diferencial (Preble et al., 2014) modificado para tejido cerebral, es rápido y garantiza obtener mitocondrias puras y funcionales, que se mantienen estables y acopladas durante 3 horas posteriores a la extracción, lo que nos da una ventana temporal suficiente para poder emplearlas en ensayos *in vitro* e *in vivo* y, además mejora sustancialmente los tiempos de purificación de protocolos basados sólo en centrifugación diferencial.

De manera importante, demostramos que la co-incubación de neuronas corticales con mitocondrias y su posterior incorporación se lleva a cabo a partir de las 2 horas de incubación y aumenta la actividad oxidoreductora mitocondrial, usada como parámetro de viabilidad neuronal, como lo muestran los datos de reducción de MTT (figura 21). Estos resultados son similares a lo que se ha reportado previamente en células PC-12 (Gollihue et al., 2018) y sobre la mejoría en la incorporación con el uso de péptidos de penetración celular como Pep1 (Chang et al., 2017, 2016). Actualmente no existe un consenso acerca de si el uso de este tipo de péptidos es necesario para las estrategias de trasplante ya que, si bien parecen incrementar la internalización de mitocondrias, no se sabe si esto pueda ser perjudicial, aunado al hecho de que la captura de las mitocondrias se lleva a cabo de manera fisiológica. Sin embargo, en este trabajo no encontramos una reducción de la viabilidad utilizando esta estrategia para la internalización mitocondrial. Una observación consistente en los ensayos *in vitro* es que la internalización de las mitocondrias no ocurrió de manera homogénea en las células en cultivo, es decir, neuronas adyacentes presentan diferentes grados de incorporación de mitocondrias exógenas. Se sabe que diferentes tipos celulares tienen diferentes probabilidades de incorporar mitocondrias exógenas presumiblemente por las propiedades endocíticas de cada tipo celular (Clark and Shay, 1982) por lo que diferentes tipos neuronales tendrían diferentes grados de incorporación, sin embargo es algo que no se ha investigado. Otra posibilidad es que las neuronas estén en diferentes estados metabólicos que favorezcan la incorporación de las mitocondrias, como sucede en neuronas que han sido privadas de

glucosa y oxígeno (Hayakawa et al., 2016) o en modelos de daño isquémico (Shin et al., 2017).

En cualquier caso, es claro que con el protocolo reportado logramos incorporar mitocondrias exógenas en la red mitocondrial de neuronas en cultivo, aunque no hay un mecanismo exclusivo que explique dicho fenómeno. Hasta la fecha, se han descrito algunos mecanismos que subyacen a la incorporación de mitocondrias a las células, en donde la endocitosis parece ser el mecanismo predominante (Islam et al., 2012) ya que al bloquear la polimerización de actina, la endocitosis dependiente de clatrina y caveolas, y la macropinocitosis, se demostró su papel destacado (Pacak et al., 2015). Sin embargo, otros trabajos han descrito que en células cancerosas y de riñón la macropinocitosis participa como un mecanismo de captación mitocondrial que requiere la integridad de la membrana externa mitocondrial (Kesner et al., 2016).

Otros mecanismos se han estudiado recientemente, por ejemplo, se ha observado que la proteína de transporte mitocondrial Miro1, así como la proteína de unión conexina 43 pueden regular el movimiento mitocondrial desde las CMM a las células epiteliales (Ahmad et al., 2014; Tseng et al., 2020; Yao et al., 2018) y en el SNC las vesículas liberadas por astrocitos que contienen mitocondrias son internalizadas por las neuronas por un mecanismo dependiente del receptor de membrana CD38 (Hayakawa et al., 2016). El papel de CD38 en la transferencia mitocondrial ha sido respaldado por estudios realizados en células de glioma humano donde la internalización de las mitocondrias fue mediada por la señalización NAD⁺-CD38-cADPR-Ca²⁺ (Sun et al., 2019) y por trabajos en modelos de la enfermedad de Alexander, donde la presencia de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP, por sus siglas en inglés) redujo la expresión de CD38 y alteró la transferencia de mitocondrial entre neuronas y astrocitos (Gao et al., 2019).

Por su parte, para el trasplante de mitocondrias *in vivo* se han desarrollado dos métodos principales: la administración sistémica de mitocondrias o la inyección directa en el órgano dañado (figura 9). La inyección sistémica permite una distribución global de mitocondrias funcionales, que pueden facilitar la entrega a cualquier órgano incluso cuando es de difícil

acceso como el cerebro (McCully et al., 2017; Shi et al., 2017). Sin embargo, no se tiene un control específico de la administración y podría afectar sitios que no lo requieran. Por su parte, la inyección directa resulta eficiente ya que permite administrar una concentración de mitocondrias de manera focal en el sitio específico del cerebro que se quiera analizar. En nuestro caso, mediante cirugía estereotáxica logramos inyectar mitocondrias exógenas que pudieron internalizarse en tejido neuronal y ser detectadas 24 horas después de la infusión, sin que los ratones presentaran alteraciones conductuales y de motricidad.

Nuestros datos indican que las mitocondrias exógenas se localizan cerca del sitio de infusión principalmente en neuronas de la región CA1 del hipocampo, lo que es consistente con los informes en donde las neuronas corticales (Hayakawa et al., 2016), hipocampales (Alexander et al., 2021; Zhao et al., 2020) de la sustancia nigra (Chang et al., 2021, 2016; Shi et al., 2017) y la medula espinal (Gollihue et al., 2018), son capaces de incorporar mitocondrias exógenas. Sin embargo, no se puede descartar que algunas mitocondrias que se observan fuera de células neuronales, hayan sido captadas por células gliales o inmunes como se ha reportado previamente (revisado en: Espino De La Fuente-Muñoz and Arias, 2021), o bien, que permanezcan en el parénquima cerebral o vasos sanguíneos y permitan una distribución mayor. En este sentido, se ha reconocido que existen mitocondrias libres y funcionales en muestras de sangre de modelos animales y humanos (Al Amir Dache et al., 2020; Song et al., 2020), así como en el líquido cefalorraquídeo (Caicedo et al., 2021), permitiendo la interacción de mitocondrias con una gran variedad de células.

Aunque por el momento sólo se diseñó la estrategia experimental para el trasplante mitocondrial sin daño aparente en la conducta de los roedores, y no se evaluaron aspectos que indiquen un papel protector, recientemente se han considerado varios factores que no explican completamente el efecto protector de administración *in vivo* de mitocondrias para aliviar el daño de ciertos órganos. Un grupo en particular (Bertero et al., 2020, 2018), cuestiona la viabilidad mitocondrial después de la exposición a altas concentraciones extracelulares de Ca^{2+} durante el procedimiento de trasplante y pone en duda si el número de mitocondrias son suficientes para recuperar el déficit bioenergético observado en los modelos

experimentales, lo que ha llevado a la discusión de cómo es que funciona el trasplante mitocondrial *in vivo*.

Sin embargo, algunas preguntas comienzan a ser respondidas y nuevas estrategias se siguen desarrollando. Por ejemplo, se ha demostrado experimentalmente que las mitocondrias pueden permanecer funcionales en altas concentraciones de calcio (McCully et al., 2020), así como de forma libres en el torrente sanguíneo y en el líquido cefalorraquídeo (Caicedo et al., 2021; Song et al., 2020). Evidencia creciente sugiere que la cantidad de mitocondrias que se internalizan podría activar vías de señalización que promuevan la sobrevivencia neuronal como en el caso de las mitocondrias astrocíticas donadas a neuronas, en donde se activan las vías de Akt y BCL-XL (Hayakawa et al., 2016), o bien la activación de enzimas que ayuden a preservar la actividad metabólica, como en el caso de la hexoquinasa 1, que tienen un dominio de unión para interactuar con la membrana externa de la mitocondria y participar en la regulación mediada por Akt (Robey and Hay, 2006). Se están desarrollando nuevas estrategias de trasplante mitocondrial, como la administración nasal de mitocondrias en modelos donde esta administración es capaz de revertir los déficits cognitivos inducidos por la quimioterapia con cisplatino a través de activar la respuesta al estrés oxidante, la reparación y replicación del DNA, así como la sinaptogénesis, mientras que se inactivan las vías de señalización relacionadas con la disfunción motora y la mortalidad (Alexander et al., 2021).

Por último, un factor importante a considerar es la respuesta inmune que podría desencadenar el trasplante mitocondrial. Sin embargo, algunos trabajos muestran que las mitocondrias autólogas no activan la respuesta inmune después de ser trasplantadas (Masuzawa et al., 2013), y que la administración intraperitoneal de mitocondrias singénicas y alogénicas no induce una respuesta alorreactiva (Ramirez-Barbieri et al., 2018), lo que es congruente con las pruebas de campo abierto, donde no se observan diferencias en la conducta exploratoria y motora de los animales trasplantados, demostrando que, al menos a corto plazo, el trasplante no indujo una conducta anormal en los animales.

9. CONCLUSIONES

De acuerdo con los datos obtenidos, hemos descrito que en las presinapsis existe una disminución en la bioenergética mitocondrial asociada con el envejecimiento principalmente en la región del cerebelo, y que se exagera en la corteza cerebral y particularmente en el hipocampo de los ratones 3xTg-AD. Esta disfunción mitocondrial se acompañó por un incremento significativo de la forma activa p-Drp1 (Ser616) relacionada con la fragmentación mitocondrial excesiva, así como por la presencia de alteraciones ultraestructurales y la acumulación intra mitocondrial de A β y tau. En conjunto, los resultados demuestran el papel destacado del envejecimiento en la vulnerabilidad de las mitocondrias sinápticas de diferentes regiones del cerebro y el papel de la condición patológica que incrementa el daño en los individuos viejos, lo que puede promover aún más la disfunción sináptica.

Lo anterior sugiere que las estrategias de restauración bioenergética podrían ser una herramienta útil para preservar la función sináptica durante el envejecimiento y en las primeras etapas de la EA. En relación con ello, hemos desarrollado una metodología rápida y eficiente para aislar mitocondrias de la corteza cerebral que se mantienen funcionales hasta tres horas posteriores a su purificación, lo que permite emplearlas en estrategias de trasplante. Los resultados del modelo *in vitro* indican que la incorporación de mitocondrias exógenas a las neuronas y su red mitocondrial ocurre en un periodo aproximado de dos horas y puede potenciarse mediante péptidos de penetración celular que incrementen la internalización en las células blanco, mejorando su actividad mitocondrial. Por su parte, los datos del modelo *in vivo* demuestran que el trasplante mitocondrial es viable y que las mitocondrias pueden ser captadas por neuronas del SNC sin comprometer el comportamiento de los ratones analizados. Esta primera aproximación experimental permitirá desarrollar el trasplante mitocondrial como herramienta en modelos de enfermedades asociadas con la edad como en el ratón 3xTg-AD.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham, W.C., Williams, J.M., Mason-Parker, S.E., Tate, W.P., Thompson, V.L., 2002. Synaptic activity-dependent modulation of mitochondrial gene expression in the rat hippocampus. *Mol. Brain Res.* 60, 50–56. [https://doi.org/10.1016/s0169-328x\(98\)00165-x](https://doi.org/10.1016/s0169-328x(98)00165-x)
- Adami, P.V.M., Quijano, C., Magnani, N., Galeano, P., Evelson, P., Cassina, A., Do Carmo, S., Leal, M.C., Castaño, E.M., Cuello, A.C., Morelli, L., 2017. Synaptosomal bioenergetic defects are associated with cognitive impairment in a transgenic rat model of early Alzheimer's disease. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 37, 69–84. <https://doi.org/10.1177/0271678X15615132>
- Ahmad, T., Aggarwal, K., Pattnaik, B., Mukherjee, S., Sethi, T., Tiwari, B.K., Kumar, M., Micheal, A., Mabalirajan, U., Ghosh, B., Sinha Roy, S., Agrawal, A., 2013. Computational classification of mitochondrial shapes reflects stress and redox state. *Cell Death Dis.* 4, e461–e461. <https://doi.org/10.1038/cddis.2012.213>
- Ahmad, T., Mukherjee, S., Pattnaik, B., Kumar, M., Singh, S., Kumar, M., Rehman, R., Tiwari, B.K., Jha, K.A., Barhanpurkar, A.P., Wani, M.R., Roy, S.S., Mabalirajan, U., Ghosh, B., Agrawal, A., 2014. Miro1 regulates intercellular mitochondrial transport & enhances mesenchymal stem cell rescue efficacy. *EMBO J.* 33, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/emboj.201386030>
- Al Amir Dache, Z., Otandault, A., Tanos, R., Pastor, B., Meddeb, R., Sanchez, C., Arena, G., Lasorsa, L., Bennett, A., Grange, T., El Messaoudi, S., Mazard, T., Prevostel, C., Thierry, A.R., 2020. Blood contains circulating cell-free respiratory competent mitochondria. *FASEB J.* 34, 3616–3630. <https://doi.org/10.1096/fj.201901917RR>
- Alexander, J.F., Seua, A. V., Arroyo, L.D., Ray, P.R., Wangzhou, A., Heiß-Lückemann, L., Schedlowski, M., Price, T.J., Kavelaars, A., Heijnen, C.J., 2021. Nasal administration of mitochondria reverses chemotherapy-induced cognitive deficits. *Theranostics* 11, 3109. <https://doi.org/10.7150/THNO.53474>
- Alikhani, N., Guo, L., Yan, S., Du, H., Pinho, C.M., Chen, J.X., Glaser, E., Yan, S.S., 2011. Decreased proteolytic activity of the mitochondrial amyloid- β degrading enzyme, PreP peptidase, in Alzheimer's disease brain mitochondria. *J. Alzheimer's Dis.* 27, 75–87. <https://doi.org/10.3233/JAD-2011-101716>
- Andersen, B.B., Gundersen, H.J.G., Pakkenberg, B., 2003. Aging of the Human Cerebellum: A Stereological Study. *J. Comp. Neurol.* 466, 356–365. <https://doi.org/10.1002/cne.10884>
- Area-Gomez, E., Schon, E.A., 2016. Mitochondria-associated ER membranes and Alzheimer disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* <https://doi.org/10.1016/j.gde.2016.04.006>
- Arendt, T., Brückner, M.K., Morawski, M., Jäger, C., Gertz, H.J., 2015. Early neurone loss in Alzheimer's disease: cortical or subcortical? *Acta Neuropathol. Commun.* 3, 10. <https://doi.org/10.1186/s40478-015-0187-1>
- Aschenbrenner, A.J., Gordon, B.A., Benzinger, T.L.S., Morris, J.C., Hassenstab, J.J., 2018. Influence of tau PET, amyloid PET, and hippocampal volume on cognition in Alzheimer disease. *Neurology* 91, e859–e866. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000006075>
- Atamna, H., Boyle, K., 2006. Amyloid-beta peptide binds with heme to form a peroxidase: Relationship to the cytopathologies of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 3381–3386. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600134103>
- Atlante, A., Amadoro, G., Bobba, A., de Bari, L., Corsetti, V., Pappalardo, G., Marra, E., Calissano, P., Passarella, S., 2008. A peptide containing residues 26-44 of tau protein impairs mitochondrial oxidative phosphorylation acting at the level of the adenine nucleotide translocator. *Biochim. Biophys. Acta* -

Bioenerg. 1777, 1289–1300. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.07.004>

- Baek, S.H., Park, S.J., Jeong, J.I., Kim, S.H., Han, J.J.-W.W., Kyung, J.W., Baik, S.-H.H., Choi, Y., Choi, B.Y., Park, J.S., Bahn, G., Shin, J.H., Jo, D.-G.G.D.S., Lee, J.-Y.Y., Jang, C.-G.G., Arumugam, T. V., Kim, J., Han, J.J.-W.W., Koh, J.-Y.Y., Cho, D.-H.H., Jo, D.-G.G.D.S., 2017. Inhibition of Drp1 Ameliorates Synaptic Depression, A β Deposition, and Cognitive Impairment in an Alzheimer's Disease Model. *J. Neurosci.* 37, 5099–5110. <https://doi.org/10.1007/BF01973074>
- Barbier, P., Zejneli, O., Martinho, M., Lasorsa, A., Belle, V., Smet-Nocca, C., Tsvetkov, P.O., Devred, F., Landrieu, I., 2019. Role of tau as a microtubule-associated protein: Structural and functional aspects. *Front. Aging Neurosci.* <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00204>
- Beck, S.J., Guo, L., Phensy, A., Tian, J., Wang, L., Tandon, N., Gauba, E., Lu, L., Pascual, J.M., Kroener, S., Du, H., 2016. Deregulation of mitochondrial FIFO-ATP synthase via OSCP in Alzheimer's disease. *Nat. Commun.* 7, 11483. <https://doi.org/10.1038/ncomms11483>
- Belfiore, R., Rodin, A., Ferreira, E., Velazquez, R., Branca, C., Caccamo, A., Oddo, S., 2019. Temporal and regional progression of Alzheimer's disease-like pathology in 3xTg-AD mice. *Aging Cell* 18, e12873. <https://doi.org/10.1111/ace1.12873>
- Bender, T., Lewrenz, I., Franken, S., Baitzel, C., Voos, W., 2011. Mitochondrial enzymes are protected from stress-induced aggregation by mitochondrial chaperones and the Pim1/LON protease. *Mol. Biol. Cell* 22, 541–554. <https://doi.org/10.1091/mbc.E10-08-0718>
- Bergmans, B.A., De Strooper, B., 2010. γ -secretases: from cell biology to therapeutic strategies. *Lancet Neurol.* [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70332-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70332-1)
- Berridge, M. V, McConnell, M.J., Grasso, C., Bajzikova, M., Kovarova, J., Neuzil, J., 2016. Horizontal transfer of mitochondria between mammalian cells: Beyond co-culture approaches, *Current Opinion in Genetics and Development.* Elsevier Current Trends. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2016.04.003>
- Bertero, E., Maack, C., O'Rourke, B., 2018. Mitochondrial transplantation in humans: “magical” cure or cause for concern? *J. Clin. Invest.* 128, 5191–5194. <https://doi.org/10.1172/JCI124944>
- Bertero, E., O'Rourke, B., Maack, C., 2020. Mitochondria do not survive calcium overload during transplantation. *Circ. Res.* <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.316291>
- Biernat, J., Gustke, N., Drewes, G., Mandelkow, E., Mandelkow, E., 1993. Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: Distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron* 11, 153–163. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90279-Z](https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90279-Z)
- Bosetti, F., Brizzi, F., Barogi, S., Mancuso, M., Siciliano, G., Tendi, E.A., Murri, L., Rapoport, S.I., Solaini, G., 2002. Cytochrome c oxidase and mitochondrial FIFO-ATPase (ATP synthase) activities in platelets and brain from patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 23, 371–376. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(01\)00314-1](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(01)00314-1)
- Braak, H., Braak, E., 1991. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* <https://doi.org/10.1007/BF00308809>
- Breukel, A.I., Besselsen, E., Ghijsen, W.E., 1997. Synaptosomes. A model system to study release of multiple classes of neurotransmitters. *Methods Mol. Biol.* 72, 33–47. <https://doi.org/10.1385/0-89603-394-5:33>
- Brothers, H.M., Gosztyla, M.L., Robinson, S.R., 2018. The physiological roles of amyloid- β peptide hint at new ways to treat Alzheimer's disease. *Front. Aging Neurosci.* <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00118>
- Brunden, K.R., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.Y., 2009. Advances in tau-focused drug discovery for Alzheimer's disease and related tauopathies. *Nat. Rev. Drug Discov.* <https://doi.org/10.1038/nrd2959>

- Bukhari, H., Glotzbach, A., Kolbe, K., Leonhardt, G., Loosse, C., Müller, T., 2017. Small things matter: Implications of APP intracellular domain AICD nuclear signaling in the progression and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.* <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2017.05.005>
- Bukoreshtliev, N. V., Wang, X., Hodneland, E., Gurke, S., Barroso, J.F.V., Gerdes, H.H., 2009. Selective block of tunneling nanotube (TNT) formation inhibits intercellular organelle transfer between PC12 cells. *FEBS Lett.* 583, 1481–1488. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.03.065>
- Butterworth, R.F., Besnard, A.-M., 1990. Thiamine-dependent enzyme changes in temporal cortex of patients with Alzheimer's disease. *Metab. Brain Dis.* 5, 179–184. <https://doi.org/10.1007/BF00997071>
- Cabezas-Opazo, F.A., Vergara-Pulgar, K., Pérez, M.J., Jara, C., Osorio-Fuentealba, C., Quintanilla, R.A., 2015. Mitochondrial Dysfunction Contributes to the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015, 509654. <https://doi.org/10.1155/2015/509654>
- Caicedo, A., Zambrano, K., Sanon, S., Gavilanes, A.W.D., 2021. Extracellular mitochondria in the cerebrospinal fluid (CSF): Potential types and key roles in central nervous system (CNS) physiology and pathogenesis. *Mitochondrion.* <https://doi.org/10.1016/j.mito.2021.02.006>
- Calvo-Rodriguez, M., Hou, S.S., Snyder, A.C., Kharitonova, E.K., Russ, A.N., Das, S., Fan, Z., Muzikansky, A., Garcia-Alloza, M., Serrano-Pozo, A., Hudry, E., Bacskai, B.J., 2020. Increased mitochondrial calcium levels associated with neuronal death in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat. Commun.* 11. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16074-2>
- Celis-De la Rosa, A. de J., Cabrera-Pivaral, C.E., Báez-Báez, M.G.L., Celis-Orozco, A., Gabriel-Ortiz, G., Zavala-González, M.A., 2018. Mortalidad por enfermedad de Alzheimer en México de 1980 a 2014. *Gac. Med. Mex.* 154, 550–554. <https://doi.org/10.24875/GMM.18003361>
- Cenini, G., Rub, C., Bruderek, M., Voos, W., 2016. Amyloid β -peptides interfere with mitochondrial preprotein import competence by a coaggregation process. *Mol. Biol. Cell* 27, 3257–3272. <https://doi.org/10.1091/mbc.e16-05-0313>
- Chang, J.-C., Chao, Y.-C., Chang, H.-S., Wu, Y.-L., Chang, H.-J., Lin, Y.-S., Cheng, W.-L., Lin, T.-T., Liu, C.-S., 2021. Intranasal delivery of mitochondria for treatment of Parkinson's Disease model rats lesioned with 6-hydroxydopamine. *Sci. Reports* 2021 111 11, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90094-w>
- Chang, J.C., Chang, H.S., Wu, Y.C., Cheng, W.L., Lin, T.T., Chang, H.J., Kuo, S.J., Chen, S.T., Liu, C.S., 2019. Mitochondrial transplantation regulates antitumour activity, chemoresistance and mitochondrial dynamics in breast cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 38. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1028-z>
- Chang, J.C., Hoel, F., Liu, K.H., Wei, Y.H., Cheng, F.C., Kuo, S.J., Tronstad, K.J., Liu, C.S., 2017. Peptide-mediated delivery of donor mitochondria improves mitochondrial function and cell viability in human cybrid cells with the MELAS A3243G mutation. *Sci. Rep.* 7, 10710. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10870-5>
- Chang, J.C., Wu, S.L., Liu, K.H., Chen, Y.H., Chuang, C. Sen, Cheng, F.C., Su, H.L., Wei, Y.H., Kuo, S.J., Liu, C.S., 2016. Allogeneic/xenogeneic transplantation of peptide-labeled mitochondria in Parkinson's disease: Restoration of mitochondria functions and attenuation of 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. *Transl. Res.* 170, 40-56e3. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2015.12.003>
- Chen, H., Chan, D.C., 2009. Mitochondrial dynamics-fusion, fission, movement, and mitophagy-in neurodegenerative diseases. *Hum. Mol. Genet.* 18, R169–R176. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp326>
- Chen, H., McCaffery, J.M., Chan, D.C., 2007. Mitochondrial Fusion Protects against Neurodegeneration in the Cerebellum. *Cell* 130, 548–562. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.026>
- Cheng, Y., Bai, F., 2018. The association of tau with mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease.

Front. Neurosci. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00163>

- Cho, D.-H., Nakamura, T., Fang, J., Cieplak, P., Godzik, A., Gu, Z., Lipton, S. a, 2009. S-Nitrosylation of Drp1 Mediates β -Amyloid: Related Mitochondrial Fission and Neuronal Injury. *Science* (80-.). 324, 102–105. <https://doi.org/10.2307/20493645>
- Chou, S.H.Y.H.-Y., Lan, J., Esposito, E., Ning, M.M., Balaj, L., Ji, X., Lo, E.H., Hayakawa, K., 2017. Extracellular Mitochondria in Cerebrospinal Fluid and Neurological Recovery after Subarachnoid Hemorrhage. *Stroke* 48, 2231–2237. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.117.017758>
- Clark, M.A., Shay, J.W., 1982. Mitochondrial transformation of mammalian cells. *Nature* 295, 605–607. <https://doi.org/10.1038/295605a0>
- Clavaguera, F., Bolmont, T., Crowther, R.A., Abramowski, D., Frank, S., Probst, A., Fraser, G., Stalder, A.K., Beibel, M., Staufenbiel, M., Jucker, M., Goedert, M., Tolnay, M., 2009. Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat. Cell Biol.* 11, 909–913. <https://doi.org/10.1038/ncb1901>
- Congdon, E.E., Sigurdsson, E.M., 2018. Tau-targeting therapies for Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0013-z>
- Cowan, D.B., Yao, R., Akurathi, V., Snay, E.R., Thedsanamoorthy, J.K., Zurakowski, D., Ericsson, M., Friehs, I., Wu, Y., Levitsky, S., Del Nido, P.J., Packard, A.B., McCully, J.D., 2016. Intracoronary delivery of mitochondria to the ischemic heart for cardioprotection. *PLoS One* 11, e0160889. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160889>
- Crouch, P.J., Barnham, K.J., Duce, J.A., Blake, R.E., Masters, C.L., Trounce, I.A., 2006. Copper-dependent inhibition of cytochrome c oxidase by $A\beta$ 1-42 requires reduced methionine at residue 35 of the $A\beta$ peptide. *J. Neurochem.* 99, 226–236. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04050.x>
- Cunha, R.A., Vizi, E.S., Ribeiro, J.A., Sebastião, A.M., 1996. Preferential release of ATP and its extracellular catabolism as a source of adenosine upon high- but not low-frequency stimulation of rat hippocampal slices. *J. Neurochem.* 67, 2180–2187. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1996.67052180.x>
- David, D.C., Hauptmann, S., Scherping, I., Schuessel, K., Keil, U., Rizzu, P., Ravid, R., Dröse, S., Brandt, U., Müller, W.E., Eckert, A., Götz, J., Scherping, I., Rizzu, P., Dröse, S., Götz, J., Brandt, U., David, D.C., Hauptmann, S., Schuessel, K., Eckert, A., Müller, W.E., Ravid, R., 2005. Proteomic and functional analyses reveal a mitochondrial dysfunction in P301L tau transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 280, 23802–23814. <https://doi.org/10.1074/jbc.m500356200>
- Davies, C.A., Mann, D.M.A., Sumpter, P.Q., Yates, P.O., 1987. A quantitative morphometric analysis of the neuronal and synaptic content of the frontal and temporal cortex in patients with Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci.* 78, 151–164. [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(87\)90057-8](https://doi.org/10.1016/0022-510X(87)90057-8)
- Davies, P., Maloney, A.J.F., 1976. SELECTIVE LOSS OF CENTRAL CHOLINERGIC NEURONS IN ALZHEIMER'S DISEASE. *Lancet.* [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(76\)91936-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(76)91936-X)
- Davis, C.O., Kim, K.-Y., Bushong, E.A., Mills, E.A., Boassa, D., Shih, T., Kinebuchi, M., Phan, S., Zhou, Y., Bihlmeyer, N.A., Nguyen, J. V, Jin, Y., Ellisman, M.H., Marsh-Armstrong, N., 2014. Transcellular degradation of axonal mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 9633–9638. <https://doi.org/10.1073/pnas.1404651111>
- De Calignon, A., Polydoro, M., Suárez-Calvet, M., William, C., Adamowicz, D.H., Kopeikina, K.J., Pitstick, R., Sahara, N., Ashe, K.H., Carlson, G.A., Spires-Jones, T.L., Hyman, B.T., 2012. Propagation of Tau Pathology in a Model of Early Alzheimer's Disease. *Neuron* 73, 685–697. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.11.033>
- Devi, L., Prabhu, B.M., Galati, D.F., Avadhani, N.G., Anandatheerthavarada, H.K., 2006. Accumulation of

- Amyloid Precursor Protein in the Mitochondrial Import Channels of Human Alzheimer's Disease Brain Is Associated with Mitochondrial Dysfunction. *J. Neurosci.* 26, 9057–9068. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.1469-06.2006>
- Divakaruni, S.S., Van Dyke, A.M., Chandra, R., LeGates, T.A., Contreras, M., Dharmasri, P.A., Higgs, H.N., Lobo, M.K., Thompson, S.M., Blanpied, T.A., 2018. Long-Term Potentiation Requires a Rapid Burst of Dendritic Mitochondrial Fission during Induction. *Neuron* 100, 860-875.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.09.025>
- Doulamis, I.P., Guariento, A., Duignan, T., Orfany, A., Kido, T., Zurakowski, D., del Nido, P.J., McCully, J.D., 2019. Mitochondrial transplantation for myocardial protection in diabetic hearts. *Eur. J. Cardio-Thoracic Surg.* 57, 836–845. <https://doi.org/10.1093/ejcts/ezz326>
- Du, F., Yu, Q., Yan, S., Hu, G., Lue, L.F., Walker, D.G., Wu, L., Yan, S.F., Tieu, K., Yan, S.S., 2017. PINK1 signalling rescues amyloid pathology and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Brain* 140, 3233–3251. <https://doi.org/10.1093/brain/awx258>
- Du, H., Guo, L., Yan, S., Sosunov, A.A., McKhann, G.M., ShiDu Yan, S., 2010. Early deficits in synaptic mitochondria in an Alzheimer's disease mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 18670–18675. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006586107>
- Du, H., Yan, S.S. Du, 2010. Mitochondrial permeability transition pore in Alzheimer's disease: Cyclophilin D and amyloid beta. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.07.005>
- Dujardin, S., Lécolle, K., Caillierez, R., Bégard, S., Zommer, N., Lachaud, C., Carrier, S., Dufour, N., Aurégan, G., Winderickx, J., Hantraye, P., Déglon, N., Colin, M., Buée, L., 2014. Neuron-to-neuron wild-type Tau protein transfer through a trans-synaptic mechanism: relevance to sporadic tauopathies. *Acta Neuropathol. Commun.* 2, 14. <https://doi.org/10.1186/2051-5960-2-14>
- Dupont, M., Souriant, S., Lugo-Villarino, G., Maridonneau-Parini, I., Vérolet, C., 2018. Tunneling nanotubes: Intimate communication between myeloid cells. *Front. Immunol.* <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00043>
- Emani, S.M., McCully, J.D., 2018. Mitochondrial transplantation: Applications for pediatric patients with congenital heart disease, *Translational Pediatrics.* AME Publishing Company. <https://doi.org/10.21037/tp.2018.02.02>
- Emani, S.M., Piekarski, B.L., Harrild, D., del Nido, P.J., McCully, J.D., 2017. Autologous mitochondrial transplantation for dysfunction after ischemia-reperfusion injury. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 154, 286–289. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2017.02.018>
- Erecinska, M., Cherian, S., Silver, I.A., 2004. Energy metabolism in mammalian brain during development. *Prog. Neurobiol.* <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2004.06.003>
- Espino De La Fuente-Muñoz, C., Arias, C., 2021. The therapeutic potential of mitochondrial transplantation for the treatment of neurodegenerative disorders. *Rev. Neurosci.* 32, 203–217. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2020-0068>
- Falchi, A.M., Sogos, V., Saba, F., Piras, M., Congiu, T., Piludu, M., 2013. Astrocytes shed large membrane vesicles that contain mitochondria, lipid droplets and ATP. *Histochem. Cell Biol.* 139, 221–231. <https://doi.org/10.1007/s00418-012-1045-x>
- Fang, E.F., Hou, Y., Palikaras, K., Adriaanse, B.A., Kerr, J.S., Yang, B., Lautrup, S., Hasan-Olive, M.M., Caponio, D., Dan, X., Rocktäschel, P., Croteau, D.L., Akbari, M., Greig, N.H., Fladby, T., Nilsen, H., Cader, M.Z., Mattson, M.P., Tavernarakis, N., Bohr, V.A., 2019. Mitophagy inhibits amyloid- β and tau pathology and reverses cognitive deficits in models of Alzheimer's disease. *Nat. Neurosci.* 1. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0332-9>

- Ferrari, F., Gorini, A., Villa, R.F., 2015. Energy metabolism of synaptosomes from different neuronal systems of rat cerebellum during aging: a functional proteomic characterization. *Neurochem Res* 40, 172–185. <https://doi.org/10.1007/s11064-014-1482-0>
- Flannery, P.J., Trushina, E., 2019. Mitochondrial dynamics and transport in Alzheimer's disease. *Mol. Cell. Neurosci.* <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2019.06.009>
- Fonseca, A.C.R.G., Moreira, P.I., Oliveira, C.R., Cardoso, S.M., Pinton, P., Pereira, C.F., 2015. Amyloid-Beta Disrupts Calcium and Redox Homeostasis in Brain Endothelial Cells. *Mol. Neurobiol.* 51, 610–622. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8740-7>
- Frost, B., Ollesch, J., Wille, H., Diamond, M.I., 2009. Conformational diversity of wild-type tau fibrils specified by templated conformation change. *J. Biol. Chem.* 284, 3546–3551. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805627200>
- Fu, A., Hou, Y., Yu, Z., Zhao, Z., Liu, Z., 2019. Healthy mitochondria inhibit the metastatic melanoma in lungs. *Int. J. Biol. Sci.* 15, 2707–2718. <https://doi.org/10.7150/ijbs.38104>
- Gao, L., Zhang, Z., Lu, J., Pei, G., 2019. Mitochondria Are Dynamically Transferring Between Human Neural Cells and Alexander Disease-Associated GFAP Mutations Impair the Astrocytic Transfer. *Front. Cell. Neurosci.* 13, 316. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00316>
- Gerencser, A.A., Doczi, J., Töröcsik, B., Bossy-Wetzel, E., Adam-Vizi, V., 2008. Mitochondrial swelling measurement in situ by optimized spatial filtering: Astrocyte-neuron differences. *Biophys. J.* 95, 2583–2598. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.118620>
- Gollihue, J.L., Patel, S.P., Eldahan, K.C., Cox, D.H., Donahue, R.R., Taylor, B.K., Sullivan, P.G., Rabchevsky, A.G., 2018. Effects of Mitochondrial Transplantation on Bioenergetics, Cellular Incorporation, and Functional Recovery after Spinal Cord Injury. *J. Neurotrauma* 35, 1800–1818. <https://doi.org/10.1089/neu.2017.5605>
- Gollihue, J.L., Patel, S.P., Mashburn, C., Eldahan, K.C., Sullivan, P.G., Rabchevsky, A.G., 2017. Optimization of mitochondrial isolation techniques for intraspinal transplantation procedures. *J. Neurosci. Methods* 287, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2017.05.023>
- Gollihue, J.L., Rabchevsky, A.G., 2017. Prospects for therapeutic mitochondrial transplantation. *Mitochondrion.* <https://doi.org/10.1016/j.mito.2017.05.007>
- Gong, C. -X, Singh, T.J., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., 1993. Phosphoprotein Phosphatase Activities in Alzheimer Disease Brain. *J. Neurochem.* 61, 921–927. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1993.tb03603.x>
- Gong, Y., Chang, L., Viola, K.L., Lacor, P.N., Lambert, M.P., Finch, C.E., Krafft, G.A., Klein, W.L., 2003. Alzheimer's disease-affected brain: Presence of oligomeric A β ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 10417–10422. <https://doi.org/10.1073/pnas.1834302100>
- Gower, A.J., Lamberty, Y., 1993. The aged mouse as a model of cognitive decline with special emphasis on studies in NMRI mice. *Behav. Brain Res.* 57, 163–173. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(93\)90132-A](https://doi.org/10.1016/0166-4328(93)90132-A)
- Greenfield, J.P., Tsai, J., Gouras, G.K., Hai, B., Thinakaran, G., Checler, F., Sisodia, S.S., Greengard, P., Xu, H., 1999. Endoplasmic reticulum and trans-Golgi network generate distinct populations of Alzheimer β -amyloid peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 742–747. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.2.742>
- Guo, T., Noble, W., Hanger, D.P., 2017. Roles of tau protein in health and disease. *Acta Neuropathol.* <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1707-9>
- Gutiérrez-Robledo, L.M., Arrieta-Cruz, I., 2015. Demencias en México: La necesidad de un Plan de Acción.

- Haass, C., Kaether, C., Thinakaran, G., Sisodia, S., 2012. Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a006270. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006270>
- Hanseeuw, B.J., Betensky, R.A., Jacobs, H.I.L., Schultz, A.P., Sepulcre, J., Becker, J.A., Cosio, D.M.O., Farrell, M., Quiroz, Y.T., Mormino, E.C., Buckley, R.F., Papp, K. V., Amariglio, R.A., Dewachter, I., Ivanoiu, A., Huijbers, W., Hedden, T., Marshall, G.A., Chhatwal, J.P., Rentz, D.M., Sperling, R.A., Johnson, K., 2019. Association of Amyloid and Tau with Cognition in Preclinical Alzheimer Disease: A Longitudinal Study. *JAMA Neurol.* 76, 915–924. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2019.1424>
- Hansson Petersen, C.A., Alikhani, N., Behbahani, H., Wiehager, B., Pavlov, P.F., Alafuzoff, I., Leinonen, V., Ito, A., Winblad, B., Glaser, E., Ankarcrona, M., 2008. The amyloid -peptide is imported into mitochondria via the TOM import machinery and localized to mitochondrial cristae. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 13145–13150. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806192105>
- Hara, Y., Yuk, F., Puri, R., Janssen, W.G.M., Rapp, P.R., Morrison, J.H., 2014. Presynaptic mitochondrial morphology in monkey prefrontal cortex correlates with working memory and is improved with estrogen treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 486–491. <https://doi.org/10.1073/pnas.1311310110>
- Hayakawa, K., Chan, S.J., Mandeville, E.T., Park, J.H., Bruzzese, M., Montaner, J., Arai, K., Rosell, A., Lo, E.H., 2018. Protective Effects of Endothelial Progenitor Cell-Derived Extracellular Mitochondria in Brain Endothelium. *Stem Cells* 36, 1404–1410. <https://doi.org/10.1002/stem.2856>
- Hayakawa, K., Esposito, E., Wang, X., Terasaki, Y., Liu, Y., Xing, C., Ji, X., Lo, E.H., 2016. Transfer of mitochondria from astrocytes to neurons after stroke. *Nature* 535, 551–555. <https://doi.org/10.1038/nature18928>
- Hernandez-Zimbron, L.F., Luna-Muñoz, J., Mena, R., Vazquez-Ramirez, R., Kubli-Garfias, C., Cribbs, D.H., Manoutcharian, K., Gevorkian, G., 2012. Amyloid- β peptide binds to cytochrome C oxidase subunit 1. *PLoS One* 7, e42344. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042344>
- Hirai, K., Aliev, G., Nunomura, A., Fujioka, H., Russell, R.L., Atwood, C.S., Johnson, A.B., Kress, Y., Vinters, H. V, Tabaton, M., Shimohama, S., Cash, a D., Siedlak, S.L., Harris, P.L., Jones, P.K., Petersen, R.B., Perry, G., Smith, M.A., 2001. Mitochondrial abnormalities in Alzheimer’s disease. *J. Neurosci.* 21, 3017–3023. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2199-01.2001> [pii]
- Hollenbeck, P.J., Saxton, W.M., 2005. The axonal transport of mitochondria. *J. Cell Sci.* 118, 5411–5419. <https://doi.org/10.1242/jcs.053850>
- Holm, M.M., Kaiser, J., Schwab, M.E., 2018. Extracellular Vesicles: Multimodal Envoys in Neural Maintenance and Repair. *Trends Neurosci.* <https://doi.org/10.1016/j.tins.2018.03.006>
- Holtzman, D.M., Morris, J.C., Goate, A.M., 2011. Alzheimer’s disease: The challenge of the second century. *Sci. Transl. Med.* <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002369>
- Hong, S., Beja-Glasser, V.F., Nfonoyim, B.M., Frouin, A., Li, S., Ramakrishnan, S., Merry, K.M., Shi, Q., Rosenthal, A., Barres, B.A., Lemere, C.A., Selkoe, D.J., Stevens, B., 2016. Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science* (80-.). 352, 712–716. <https://doi.org/10.1126/science.1238773>
- Hoover, B.R., Reed, M.N., Su, J., Penrod, R.D., Kotilinek, L.A., Grant, M.K., Pitstick, R., Carlson, G.A., Lanier, L.M., Yuan, L.L., Ashe, K.H., Liao, D., 2010. Tau Mislocalization to Dendritic Spines Mediates Synaptic Dysfunction Independently of Neurodegeneration. *Neuron* 68, 1067–1081. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.11.030>
- Houlden, H., Baker, M., McGowan, E., Lewis, P., Hutton, M., Crook, R., Wood, N.W., Kumar-Singh, S., Geddes, J., Swash, M., Scaravilli, F., Holton, J.L., Lashley, T., Tomita, T., Hashimoto, T.,

- Verkkoniemi, A., Kalimo, H., Somer, M., Paetau, A., Martin, J.-J., Van Broeckhoven, C., Golde, T., Hardy, J., Haltia, M., Revesz, T., 2000. Variant Alzheimer's disease with spastic paraparesis and cotton wool plaques is caused by PS-1 mutations that lead to exceptionally high amyloid- β concentrations. *Ann. Neurol.* 48, 806–808. [https://doi.org/10.1002/1531-8249\(200011\)48:5<806::AID-ANA18>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/1531-8249(200011)48:5<806::AID-ANA18>3.0.CO;2-F)
- Huang, P.J., Kuo, C.C., Lee, H.C., Shen, C.I., Cheng, F.C., Wu, S.F., Chang, J.C., Pan, H.C., Lin, S.Z., Liu, C.S., Su, H.L., 2016. Transferring xenogenic mitochondria provides neural protection against ischemic stress in ischemic rat brains. *Cell Transplant.* 25, 913–927. <https://doi.org/10.3727/096368915X689785>
- Ishihara, N., Fujita, Y., Oka, T., Mihara, K., 2006. Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. *EMBO J.* 25, 2966–2977. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601184>
- Islam, M.N., Das, S.R., Emin, M.T., Wei, M., Sun, L., Westphalen, K., Rowlands, D.J., Quadri, S.K., Bhattacharya, S., Bhattacharya, J., 2012. Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury. *Nat. Med.* 18, 759–765. <https://doi.org/10.1038/nm.2736>
- Israël, M., Whittaker, V.P., 1965. The isolation of mossy fibre endings from the granular layer of the cerebellar cortex. *Experientia* 21, 325–326. <https://doi.org/10.1007/BF02144693>
- Ivannikov, M. V., Sugimori, M., Llinás, R.R., 2013. Synaptic vesicle exocytosis in hippocampal synaptosomes correlates directly with total mitochondrial volume. *J. Mol. Neurosci.* 49, 223–230. <https://doi.org/10.1007/s12031-012-9848-8>
- Jin, H., Kanthasamy, A., Ghosh, A., Anantharam, V., Kalyanaraman, B., Kanthasamy, A.G., 2014. Mitochondria-targeted antioxidants for treatment of Parkinson's disease: Preclinical and clinical outcomes. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.09.007>
- Joshi, A.U., Minhas, P.S., Liddelow, S.A., Haileselassie, B., Andreasson, K.I., Dorn, G.W., Mochly-Rosen, D., 2019. Fragmented mitochondria released from microglia trigger A1 astrocytic response and propagate inflammatory neurodegeneration. *Nat. Neurosci.* 22, 1635–1648. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0486-0>
- Kamenetz, F., Tomita, T., Hsieh, H., Seabrook, G., Borchelt, D., Iwatsubo, T., Sisodia, S., Malinow, R., 2003. APP Processing and Synaptic Function. *Neuron* 37, 925–937. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00124-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00124-7)
- Kandimalla, R., Reddy, P.H., 2016. Multiple faces of dynamin-related protein 1 and its role in Alzheimer's disease pathogenesis. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.12.018>
- Katrangi, E., D'Souza, G., Boddapati, S. V., Kulawiec, M., Singh, K.K., Bigger, B., Weissig, V., 2007. Xenogenic transfer of isolated murine mitochondria into human ρ 0 cells can improve respiratory function. *Rejuvenation Res.* 10, 561–570. <https://doi.org/10.1089/rej.2007.0575>
- Kawamata, H., Manfredi, G., 2017. Proteinopathies and OXPHOS dysfunction in neurodegenerative diseases. *J Cell Biol* 216, 3917–3929. <https://doi.org/10.1083/JCB.201709172>
- Kaza, A.K., Wamala, I., Friehs, I., Kuebler, J.D., Rathod, R.H., Berra, I., Ericsson, M., Yao, R., Thedsanamoorthy, J.K., Zurakowski, D., Levitsky, S., del Nido, P.J., Cowan, D.B., McCully, J.D., 2017. Myocardial rescue with autologous mitochondrial transplantation in a porcine model of ischemia/reperfusion, in: *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. Mosby, pp. 934–943. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2016.10.077>
- Kesner, E.E., Saada-Reich, A., Lorberboum-Galski, H., 2016. Characteristics of Mitochondrial Transformation into Human Cells. *Sci. Rep.* 6. <https://doi.org/10.1038/srep26057>

- Kim, I., Rodriguez-Enriquez, S., Lemasters, J.J., 2007. Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch. Biochem. Biophys.* 462, 245–253. <https://doi.org/10.1016/J.ABB.2007.03.034>
- Kleele, T., Rey, T., Winter, J., Zaganelli, S., Mahecic, D., Perreten Lambert, H., Ruberto, F.P., Nemir, M., Wai, T., Pedrazzini, T., Manley, S., 2021. Distinct fission signatures predict mitochondrial degradation or biogenesis. *Nature* 1–5. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03510-6>
- Kourosh Shahpasand, Hisanaga, S. -i., Hata, K., Saito, T., Asano, T., Hasegawa, M., Shahpasand, K., Uemura, I., Toyoshima, Y., 2012. Regulation of Mitochondrial Transport and Inter-Microtubule Spacing by Tau Phosphorylation at the Sites Hyperphosphorylated in Alzheimer's Disease. *J. Neurosci.* 32, 2430–2441. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.5927-11.2012>
- Koyanagi, M., Brandes, R.P., Haendeler, J., Zeiher, A.M., Dimmeler, S., 2005. Cell-to-cell connection of endothelial progenitor cells with cardiac myocytes by nanotubes: A novel mechanism for cell fate changes? *Circ. Res.* 96, 1039–1041. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000168650.23479.0c>
- Kuo, C.C., Su, H.L., Chang, T.L., Chiang, C.Y., Sheu, M.L., Cheng, F.C., Chen, C.J., Sheehan, J., Pan, H.C., 2017. Prevention of axonal degeneration by perineurium injection of mitochondria in a sciatic nerve crush injury model. *Neurosurgery* 80, 475–488. <https://doi.org/10.1093/neuros/nyw090>
- LaFerla, F.M., Green, K.N., Oddo, S., 2007. Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 499–509. <https://doi.org/10.1038/nrn2168>
- Laird, M.D., Clerc, P., Polster, B.M., Fiskum, G., 2013. Augmentation of Normal and Glutamate-Impaired Neuronal Respiratory Capacity by Exogenous Alternative Biofuels. *Transl. Stroke Res.* 4, 643–651. <https://doi.org/10.1007/s12975-013-0275-0>
- Levy, M., Faas, G.C., Saggau, P., Craigen, W.J., Sweatt, J.D., 2003. Mitochondrial regulation of synaptic plasticity in the hippocampus. *J. Biol. Chem.* 278, 17727–17734. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212878200>
- Li, X., Zhang, Y., Yeung, S.C., Liang, Y., Liang, X., Ding, Y., Ip, M.S.M., Tse, H.-F., Mak, J.C.W., Lian, Q., 2014. Mitochondrial Transfer of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Mesenchymal Stem Cells to Airway Epithelial Cells Attenuates Cigarette Smoke-Induced Damage. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 51, 455–465. <https://doi.org/10.1165/rmb.2013-0529OC>
- Li, Z., Okamoto, K.I., Hayashi, Y., Sheng, M., 2004. The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. *Cell* 119, 873–887. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.003>
- Liu, K., Guo, L., Zhou, Z., Pan, M., Yan, C., 2019. Mesenchymal stem cells transfer mitochondria into cerebral microvasculature and promote recovery from ischemic stroke. *Microvasc. Res.* 123, 74–80. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2019.01.001>
- Liu, K., Ji, K., Guo, L., Wu, W., Lu, H., Shan, P., Yan, C., 2014. Mesenchymal stem cells rescue injured endothelial cells in an in vitro ischemia-reperfusion model via tunneling nanotube like structure-mediated mitochondrial transfer. *Microvasc. Res.* 92, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2014.01.008>
- Liu, L., Drouet, V., Wu, J.W., Witter, M.P., Small, S.A., Clelland, C., Duff, K., 2012. Trans-synaptic spread of tau pathology in vivo. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031302>
- Llanos-González, E., Henares-Chavarino, Á.A., Pedrero-Prieto, C.M., García-Carpintero, S., Frontiñán-Rubio, J., Sancho-Bielsa, F.J., Alcain, F.J., Peinado, J.R., Rabanal-Ruiz, Y., Durán-Prado, M., 2020. Interplay Between Mitochondrial Oxidative Disorders and Proteostasis in Alzheimer's Disease. *Front. Neurosci.* <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01444>
- Long, J.M., Holtzman, D.M., 2019. Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. *Cell.* <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.09.001>

- Löscher, W., Böhme, G., Müller, F., Pagliusi, S., Loscher, W., Bohme, G., Muller, F., Pagliusi, S., 1985. Improved method for isolating synaptosomes from 11 regions of one rat brain: electron microscopic and biochemical characterization and use in the study of drug effects on nerve terminal gamma-aminobutyric acid in vivo. *J Neurochem* 45, 879–889. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1985.tb04076.x>
- Mahley, R.W., Rall, S.C., 2000. Apolipoprotein E: Far more than a lipid transport protein. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 1, 507–537. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.1.1.507>
- Mamada, N., Tanokashira, D., Ishii, K., Tamaoka, A., Araki, W., 2017. Mitochondria are devoid of amyloid β -protein (A β)-producing secretases: Evidence for unlikely occurrence within mitochondria of A β generation from amyloid precursor protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 486, 321–328. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.03.035>
- Manczak, M., Anekonda, T.S., Henson, E., Park, B.S., Quinn, J., Reddy, P.H., 2006. Mitochondria are a direct site of A β accumulation in Alzheimer’s disease neurons: Implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression. *Hum. Mol. Genet.* 15, 1437–1449. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl066>
- Manczak, M., Calkins, M.J., Reddy, P.H., 2011. Impaired mitochondrial dynamics and abnormal interaction of amyloid beta with mitochondrial protein Drp1 in neurons from patients with Alzheimer’s disease: implications for neuronal damage. *Hum. Mol. Genet.* 20, 2495–2509. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr139>
- Manczak, M., Reddy, P.H., 2012. Abnormal interaction between the mitochondrial fission protein Drp1 and hyperphosphorylated tau in Alzheimer’s disease neurons: implications for mitochondrial dysfunction and neuronal damage. *Hum. Mol. Genet.* 21, 2538–47. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds072>
- Masliah, E., Mallory, M., Alford, M., DeTeresa, R., Hansen, L.A., McKeel, D.W., Morris, J.C., 2001. Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer’s disease. *Neurology* 56, 127–129. <https://doi.org/10.1212/WNL.56.1.127>
- Mastrogioacomo, F., Lindsay, J.G., Bettendorff, L., Rice, J., Kish, S.J., 1996. Brain protein and α -ketoglutarate dehydrogenase complex activity in Alzheimer’s disease. *Ann. Neurol.* 39, 592–598. <https://doi.org/10.1002/ana.410390508>
- Masuzawa, A., Black, K.M., Pacak, C.A., Ericsson, M., Barnett, R.J., Drumm, C., Seth, P., Bloch, D.B., Levitsky, S., Cowan, D.B., McCully, J.D., 2013. Transplantation of autologously derived mitochondria protects the heart from ischemia-reperfusion injury. *AJP Hear. Circ. Physiol.* 304, H966–H982. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00883.2012>
- Mavroudis, I.A., Fotiou, D.F., Adipepe, L.F., Manani, M.G., Njau, S.D., Psaroulis, D., Costa, V.G., Baloyannis, S.J., 2010. Morphological changes of the human purkinje cells and deposition of neuritic plaques and neurofibrillary tangles on the cerebellar cortex of Alzheimer’s disease. *Am. J. Alzheimers. Dis. Other Demen.* 25, 585–591. <https://doi.org/10.1177/1533317510382892>
- McCully, J.D., Cowan, D.B., Emani, S.M., del Nido, P.J., 2017. Mitochondrial transplantation: From animal models to clinical use in humans, *Mitochondrion*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2017.03.004>
- McCully, J.D., Cowan, D.B., Pacak, C.A., Toumpoulis, I.K., Dayalan, H., Levitsky, S., 2009. Injection of isolated mitochondria during early reperfusion for cardioprotection. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 296, H94–H105. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00567.2008>
- McCully, J.D., Emani, S.M., Del Nido, P.J., 2020. Letter by McCully et al Regarding Article, “Mitochondria do not survive calcium overload.” *Circ. Res.* <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.316832>
- Melentijevic, I., Toth, M.L., Arnold, M.L., Guasp, R.J., Harinath, G., Nguyen, K.C., Taub, D., Parker, J.A., Neri, C., Gabel, C. V., Hall, D.H., Driscoll, M., 2017. *C. elegans* neurons jettison protein aggregates

- and mitochondria under neurotoxic stress. *Nature* 542, 367–371. <https://doi.org/10.1038/nature21362>
- Miliotis, S., Nicolalde, B., Ortega, M., Yepez, J., Caicedo, A., 2019. Forms of extracellular mitochondria and their impact in health. *Mitochondrion*. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2019.02.002>
- Miller, K.E., 2004. Axonal mitochondrial transport and potential are correlated. *J. Cell Sci.* 117, 2791–2804. <https://doi.org/10.1242/jcs.01130>
- MITCHELL, P., 1961. Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic type of Mechanism. *Nature* 191, 144–148. <https://doi.org/10.1038/191144a0>
- Moreno-Castilla, P., Rodriguez-Duran, L.F., Guzman-Ramos, K., Barcenas-Femat, A., Escobar, M.L., Bermudez-Rattoni, F., 2016. Dopaminergic neurotransmission dysfunction induced by amyloid- β transforms cortical long-term potentiation into long-term depression and produces memory impairment. *Neurobiol. Aging* 41, 187–199. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.02.021>
- Morfini, G., Pigino, G., Beffert, U., Busciglio, J., Brady, S.T., 2002. Fast axonal transport misregulation and Alzheimer's disease. *NeuroMolecular Med.* <https://doi.org/10.1385/nmm:2:2:089>
- Morris, M.C., Depollier, J., Mery, J., Heitz, F., Divita, G., 2001. A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* 19, 1173–1176. <https://doi.org/10.1038/nbt1201-1173>
- Moschoi, R., Imbert, V., Nebout, M., Chiche, J., Mary, D., Prebet, T., Saland, E., Castellano, R., Pouyet, L., Collette, Y., Vey, N., Chabannon, C., Recher, C., Sarry, J.-E., Alcor, D., Peyron, J.-F., Griessinger, E., 2016. Protective mitochondrial transfer from bone marrow stromal cells to acute myeloid leukemic cells during chemotherapy. *Blood* 128, 253–264. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-07-655860>
- Moskowitzova, K., Liu, K., Shin, B., Ramirez-Barbieri, G.F., Guariento, A., Blitzer, D., Cowan, D.B., Thedsanamoorthy, J.K., Yao, R., Orfany, A., Visner, G., del Nido, P.J., McCully, J.D., 2018. Mitochondrial Transplantation Prolongs Cold Preservation Time in Murine Cardiac Transplantation. *J. Hear. Lung Transplant.* 37, S22–S23. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2018.01.033>
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Mossmann, D., Vögtle, F.N., Taskin, A.A., Teixeira, P.F., Ring, J., Burkhart, J.M., Burger, N., Pinho, C.M., Tadic, J., Loreth, D., Graff, C., Metzger, F., Sickmann, A., Kretz, O., Wiedemann, N., Zahedi, R.P., Madeo, F., Glaser, E., Meisinger, C., 2014. Amyloid- β peptide induces mitochondrial dysfunction by inhibition of preprotein maturation. *Cell Metab.* 20, 662–669. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.07.024>
- Mungarro-Menchaca, X., Morán, P.F.J., Clorinda, A., 2002. β -amyloid peptide induces ultrastructural changes in synaptosomes and potentiates mitochondrial dysfunction in the presence of ryanodine. *J. Neurosci. Res.* 68, 89–96. <https://doi.org/10.1002/jnr.10193>
- Murray, L.M.A., Krasnodembskaya, A.D., 2019. Concise Review: Intercellular Communication Via Organelle Transfer in the Biology and Therapeutic Applications of Stem Cells. *Stem Cells* 37, 14–25. <https://doi.org/10.1002/stem.2922>
- Murthy, V.N., Camilli, P. De, 2003. CELL BIOLOGY OF THE PRESYNAPTIC TERMINAL. *Annu. Rev. Neurosci.* 26, 701–728. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.26.041002.131445>
- Nicolás-Ávila, J.A., Lechuga-Vieco, A. V, Esteban-Martínez, L., Sánchez-Díaz, M., Díaz-García, E., Santiago, D.J., Rubio-Ponce, A., Li, J.L., Balachander, A., Quintana, J.A., Martínez-de-Mena, R., Castejón-Vega, B., Pun-García, A., Través, P.G., Bonzón-Kulichenko, E., García-Marqués, F., Cussó, L., A-González, N., González-Guerra, A., Roche-Molina, M., Martin-Salamanca, S., Crainiciuc, G.,

- Guzmán, G., Larrazabal, J., Herrero-Galán, E., Alegre-Cebollada, J., Lemke, G., Rothlin, C. V., Jimenez-Borreguero, L.J., Reyes, G., Castrillo, A., Desco, M., Muñoz-Cánoves, P., Ibáñez, B., Torres, M., Ng, L.G., Priori, S.G., Bueno, H., Vázquez, J., Cordero, M.D., Bernal, J.A., Enríquez, J.A., Hidalgo, A., 2020. A Network of Macrophages Supports Mitochondrial Homeostasis in the Heart. *Cell* 0. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.031>
- Nikoletopoulou, V., Tavernarakis, N., 2012. Calcium homeostasis in aging neurons. *Front. Genet.* <https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00200>
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J.D., Murphy, M.P., Golde, T.E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M.P., Akbari, Y., LaFerla, F.M., 2003. Triple-transgenic model of Alzheimer's Disease with plaques and tangles: Intracellular A β and synaptic dysfunction. *Neuron* 39, 409–421. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00434-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00434-3)
- Pacak, C.A., Preble, J.M., Kondo, H., Seibel, P., Levitsky, S., del Nido, P.J., Cowan, D.B., McCully, J.D., 2015. Actin-dependent mitochondrial internalization in cardiomyocytes: evidence for rescue of mitochondrial function. *Biol. Open* 4, 622–626. <https://doi.org/10.1242/bio.201511478>
- Panza, F., Lozupone, M., Logroscino, G., Imbimbo, B.P., 2019. A critical appraisal of amyloid- β -targeting therapies for Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0116-6>
- Park, H.J., Kim, S.S., Seong, Y.M., Kim, K.H., Hui, G.G., Eun, J.Y., Do, S.M., Kang, S., Rhim, H., 2006. β -Amyloid precursor protein is a direct cleavage target of HtrA2 serine protease: Implications for the physiological function of HtrA2 in the mitochondria. *J. Biol. Chem.* 281, 34277–34287. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603443200>
- Park, M.H., Choi, D.Y., Jin, H.W., Yoo, H.S., Han, J.Y., Oh, K.W., Han, S.B., Hwang, D.Y., Hong, J.T., 2012. Mutant presenilin 2 increases β -secretase activity through reactive oxygen species-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 71, 130–139. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3182432967>
- Parone, P. a., Da Druz, S., Tondera, D., Mattenberger, Y., James, D.I., Maechler, P., Barja, F., Martinou, J.C., 2008. Preventing mitochondrial fission impairs mitochondrial function and leads to loss of mitochondrial DNA. *PLoS One* 3, 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003257>
- Pepe, S., Marasco, S.F., Haas, S.J., Sheeran, F.L., Krum, H., Rosenfeldt, F.L., 2007. Coenzyme Q10 in cardiovascular disease. *Mitochondrion.* <https://doi.org/10.1016/j.mito.2007.02.005>
- Pérez, M.J., Vergara-Pulgar, K., Jara, C., Cabezas-Opazo, F., Quintanilla, R.A., 2018. Caspase-Cleaved Tau Impairs Mitochondrial Dynamics in Alzheimer's Disease. *Mol. Neurobiol.* 55, 1004–1018. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0385-x>
- Perkins, G.A., Tjong, J., Brown, J.M., Poquiz, P.H., Scott, R.T., Kolson, D.R., Ellisman, M.H., Spirou, G.A., 2010. The micro-architecture of mitochondria at active zones: Electron tomography reveals novel anchoring scaffolds and cristae structured for high-rate metabolism. *J. Neurosci.* 30, 1015–1026. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1517-09.2010>
- Picard, M., McEwen, B.S., 2014. Mitochondria impact brain function and cognition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 7–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321881111>
- Piel, D.A., Gruber, P.J., Weinheimer, C.J., Courtois, M.R., Robertson, C.M., Coopersmith, C.M., Deutschman, C.S., Levy, R.J., 2007. Mitochondrial resuscitation with exogenous cytochrome c in the septic heart. *Crit. Care Med.* 35, 2120–2127. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000278914.85340.FE>
- Plotnikov, E.Y., Khryapenkova, T.G., Galkina, S.I., Sukhikh, G.T., Zorov, D.B., 2010. Cytoplasm and organelle transfer between mesenchymal multipotent stromal cells and renal tubular cells in co-culture. *Exp. Cell Res.* 316, 2447–2455. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.06.009>

- Preble, J.M., Pacak, C.A., Kondo, H., MacKay, A.A., Cowan, D.B., McCully, J.D., 2014. Rapid Isolation And Purification Of Mitochondria For Transplantation By Tissue Dissociation And Differential Filtration. *J. Vis. Exp.* e51682. <https://doi.org/10.3791/51682>
- Querfurth, H.W., LaFerla, F.M., 2010. Alzheimer's Disease. *N. Engl. J. Med.* 362, 329–344. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0909142>
- Raffaello, A., Rizzuto, R., 2011. Mitochondrial longevity pathways. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.10.007>
- Rangaraju, V., Lauterbach, M., Schuman, E.M., 2019. Spatially Stable Mitochondrial Compartments Fuel Local Translation during Plasticity. *Cell* 176, 73-84.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.12.013>
- Raturi, A., Simmen, T., 2013. Where the endoplasmic reticulum and the mitochondrion tie the knot: The mitochondria-associated membrane (MAM). *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.04.013>
- Rhein, V., Song, X., Wiesner, A., Ittner, L.M., Baysang, G., Meier, F., Ozmen, L., Bluethmann, H., Dröse, S., Brandt, U., Savaskan, E., Czech, C., Götz, J., Eckert, A., 2009. Amyloid-beta and tau synergistically impair the oxidative phosphorylation system in triple transgenic Alzheimer's disease mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 20057–62. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905529106>
- Rizzuto, R., 2001. Intracellular Ca²⁺ pools in neuronal signalling. *Curr. Opin. Neurobiol.* [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(00\)00212-9](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(00)00212-9)
- Robey, R.B., Hay, N., 2006. Mitochondrial hexokinases, novel mediators of the antiapoptotic effects of growth factors and Akt. *Oncogene.* <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209595>
- Rogers, J., Zornetzer, S.F., Bloom, F.E., Mervis, R.E., 1984. Senescent microstructural changes in rat cerebellum. *Brain Res.* 292, 23–32. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(84\)90886-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(84)90886-2)
- Ruan, L., Zhou, C., Jin, E., Kucharavy, A., Zhang, Y., Wen, Z., Florens, L., Li, R., 2017. Cytosolic proteostasis through importing of misfolded proteins into mitochondria. *Nature* 543, 443–446. <https://doi.org/10.1038/nature21695>
- Rustom, A., Saffrich, R., Markovic, I., Walther, P., Gerdes, H.-H., 2004. Nanotubular Highways for Intercellular Organelle Transport. *Science* (80-.). 303, 1007–1010. <https://doi.org/10.1126/science.1093133>
- Sager, K.L., Wu, J., Leurgans, S.E., Rees, H.D., Gearing, M., Mufson, E.J., Levey, A.I., Lah, J.J., 2007. Neuronal LR11/SorLA expression is reduced in mild cognitive impairment. *Ann. Neurol.* 62, 640–647. <https://doi.org/10.1002/ana.21190>
- Schellenberg, G.D., Montine, T.J., 2012. The genetics and neuropathology of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* <https://doi.org/10.1007/s00401-012-0996-2>
- Scherzer, C.R., Offe, K., Gearing, M., Rees, H.D., Fang, G., Heilman, C.J., Schaller, C., Bujo, H., Levey, A.I., Lah, J.J., 2004. Loss of apolipoprotein E receptor LR11 in Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 61, 1200–1205. <https://doi.org/10.1001/archneur.61.8.1200>
- Selkoe, D.J., 2002. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 298, 789–791. <https://doi.org/10.1126/science.1074069>
- Selkoe, D.J., 2001. Alzheimer's Disease : Genes , Proteins , and Therapy. *Physiol. Rev.* 81, 741–66. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.2.741>
- Sepulveda-Falla, D., Barrera-Ocampo, A., Hagel, C., Korwitz, A., Vinueza-Veloz, M.F., Zhou, K., Schonewille, M., Zhou, H., Velazquez-Perez, L., Rodriguez-Labrada, R., Villegas, A., Ferrer, I.,

- Lopera, F., Langer, T., De Zeeuw, C.I., Glatzel, M., 2014. Familial Alzheimer's disease-associated presenilin-1 alters cerebellar activity and calcium homeostasis. *J. Clin. Invest.* 124, 1552–1567. <https://doi.org/10.1172/JCI166407>
- Shi, X., Zhao, M., Fu, C., Fu, A., 2017. Intravenous administration of mitochondria for treating experimental Parkinson's disease. *Mitochondrion* 34, 91–100. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2017.02.005>
- Shin, B., Cowan, D.B., Emani, S.M., del Nido, P.J., McCully, J.D., 2017. Mitochondrial transplantation in myocardial ischemia and reperfusion injury, in: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer, Cham, pp. 595–619. https://doi.org/10.1007/978-3-319-55330-6_31
- Shin, B., Saeed, M.Y., Esch, J.J., Guariento, A., Blitzer, D., Moskowitsova, K., Ramirez-Barbieri, G., Orfany, A., Thedsanamoorthy, J.K., Cowan, D.B., Inkster, J.A., Snay, E.R., Staffa, S.J., Packard, A.B., Zurakowski, D., del Nido, P.J., McCully, J.D., 2019. A Novel Biological Strategy for Myocardial Protection by Intracoronary Delivery of Mitochondria: Safety and Efficacy. *JACC Basic to Transl. Sci.* 4, 871–888. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2019.08.007>
- Silver, I., Erecińska, M., 1998. Oxygen and ion concentrations in normoxic and hypoxic brain cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 454, 7–16.
- Sisakhtnezhad, S., Khosravi, L., 2015. Emerging physiological and pathological implications of tunneling nanotubes formation between cells. *Eur. J. Cell Biol.* <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2015.06.010>
- Smirnova, E., Griparic, L., Shurland, D.-L.L., van der Blik, A.M., 2001. Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* 12, 2245–2256. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.8.2245>
- Smith, G.M., Gallo, G., 2018. The role of mitochondria in axon development and regeneration. *Dev. Neurobiol.* <https://doi.org/10.1002/dneu.22546>
- Snyder, E.M., Nong, Y., Almeida, C.G., Paul, S., Moran, T., Choi, E.Y., Nairn, A.C., Salter, M.W., Lombroso, P.J., Gouras, G.K., Greengard, P., 2005. Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid- β . *Nat. Neurosci.* 8, 1051–1058. <https://doi.org/10.1038/nn1503>
- Song, X., Hu, W., Yu, H., Wang, H., Zhao, Y., Korngold, R., Zhao, Y., 2020. Existence of Circulating Mitochondria in Human and Animal Peripheral Blood. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 2122. <https://doi.org/10.3390/ijms21062122>
- Sorrentino, V., Romani, M., Mouchiroud, L., Beck, J.S., Zhang, H., D'Amico, D., Moullan, N., Potenza, F., Schmid, A.W., Rietsch, S., Counts, S.E., Auwerx, J., 2017. Enhancing mitochondrial proteostasis reduces amyloid- β proteotoxicity. *Nature* 552, 187–193. <https://doi.org/10.1038/nature25143>
- Spees, J.L., Olson, S.D., Whitney, M.J., Prockop, D.J., 2006. Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 1283–1288. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510511103>
- Stamer, K., Vogel, R., Thies, E., Mandelkow, E., Mandelkow, E.M., 2002. Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. *J. Cell Biol.* 156, 1051–1063. <https://doi.org/10.1083/jcb.200108057>
- Stefanatos, R., Sanz, A., 2018. The role of mitochondrial ROS in the aging brain. *FEBS Lett.* <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12902>
- Sun, C., Liu, X., Wang, B., Wang, Z., Liu, Y., Di, C., Si, J., Li, H., Wu, Q., Xu, D., Li, J., Li, G., Wang, Y., Wang, F., Zhang, H., 2019. Endocytosis-mediated mitochondrial transplantation: Transferring normal human astrocytic mitochondria into glioma cells rescues aerobic respiration and enhances radiosensitivity. *Theranostics* 9, 3595–3607. <https://doi.org/10.7150/thno.33100>
- Sun, N., Youle, R.J., Finkel, T., 2016. The Mitochondrial Basis of Aging. *Mol. Cell.*

<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.01.028>

- Tam, J.H.K., Seah, C., Pasternak, S.H., 2014. The amyloid precursor protein is rapidly transported from the golgi apparatus to the lysosome and where it is processed into beta-Amyloid. *Mol. Brain* 7. <https://doi.org/10.1186/s13041-014-0054-1>
- Todorova, V., Blokland, A., 2016. Mitochondria and Synaptic Plasticity in the Mature and Aging Nervous System. *Curr. Neuropharmacol.* 15, 166–173. <https://doi.org/10.2174/1570159X14666160414111821>
- Torralba, D., Baixauli, F., Sánchez-Madrid, F., 2016. Mitochondria Know No Boundaries: Mechanisms and Functions of Intercellular Mitochondrial Transfer. *Front. Cell Dev. Biol.* 4, 107. <https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00107>
- Tseng, N., Lambie, S.C., Huynh, C.Q., Sanford, B., Patel, M., Herson, P.S., Ormond, D.R., 2020. Mitochondrial transfer from mesenchymal stem cells improves neuronal metabolism after oxidant injury in vitro: The role of Miro1. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* <https://doi.org/10.1177/0271678X20928147>
- Van Der Vlist, M., Raoof, R., Willemsen, H.L.D.M., Prado, J., Versteeg, S., Gil, C.M., Vos, M., Lokhorst, R.E., Pasterkamp, R.J., Kojima, T., Karasuyama, H., Khoury-Hanold, W., Meyaard, L., Eijkelkamp, N., 2020. Macrophages transfer mitochondria to sensory neurons to resolve inflammatory pain. *bioRxiv* 2020.02.12.940445. <https://doi.org/10.1101/2020.02.12.940445>
- Van Laar, V.S., Berman, S.B., 2013. The interplay of neuronal mitochondrial dynamics and bioenergetics: Implications for Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.05.015>
- Verghese, P.B., Castellano, J.M., Holtzman, D.M., 2011. Apolipoprotein E in Alzheimer's disease and other neurological disorders. *Lancet Neurol.* [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70325-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70325-2)
- Vermunt, L., Sikkes, S.A.M., van den Hout, A., Handels, R., Bos, I., van der Flier, W.M., Kern, S., Ousset, Pierre Jean, Maruff, P., Skoog, I., Verhey, F.R.J., Freund-Levi, Y., Tsolaki, Magda, Wallin, Å.K., Olde Rikkert, M., Soinen, H., Spuru, Luisa, Zetterberg, H., Blennow, K., Scheltens, Philip, Muniz-Terrera, G., Visser, P.J., Vellas, B., Reynish, E., Ousset, P. J., Andrieu, S., Burns, A., Pasquier, F., Frisoni, G., Salmon, E., Michel, J.P., Zekry, D.S., Boada, M., Dartigues, J.F., Olde-Rikkert, M.G.M., Rigaud, A.S., Winblad, B., Malick, A., Sinclair, A., Frölich, L., Scheltens, P., Ribera, C., Touchon, J., Robert, P., Salva, A., Waldemar, G., Bullock, R., Tsolaki, M., Rodriguez, G., Spuru, L., Jones, R.W., Stiens, G., Stoppe, G., Eriksdotter Jönhagen, M., Cherubini, A., Lage, P.M., Gomez-Isla, T., Camus, V., Agüera-Morales, E., Lopez, F., Savy, S., Cantet, C., Coley, N., 2019. Duration of preclinical, prodromal, and dementia stages of Alzheimer's disease in relation to age, sex, and APOE genotype. *Alzheimer's Dement.* 15, 888–898. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2019.04.001>
- Walsh, D.M., Selkoe, D.J., 2007. Aβ oligomers - A decade of discovery. *J. Neurochem.* <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04426.x>
- Wang, H.Y., Lee, D.H.S., D'Andrea, M.R., Peterson, P.A., Shank, R.P., Reitz, A.B., 2000. β-Amyloid1-42 binds to α7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology. *J. Biol. Chem.* 275, 5626–5632. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.8.5626>
- Wang, L., Guo, L., Lu, L., Sun, H., Shao, M., Beck, S.J., Li, L., Ramachandran, J., Du, Y., Du, H., 2016. Synaptosomal mitochondrial dysfunction in 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One* 11, e0150441. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150441>
- Wang, X., Bukoreshtliev, N.V., Gerdes, H.H., 2012. Developing Neurons Form Transient Nanotubes Facilitating Electrical Coupling and Calcium Signaling with Distant Astrocytes. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047429>
- Wang, X., Su, B., Fujioka, H., Zhu, X., 2008a. Dynamin-like protein 1 reduction underlies mitochondrial morphology and distribution abnormalities in fibroblasts from sporadic Alzheimer's disease patients.

Am. J. Pathol. 173, 470–82. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.071208>

- Wang, X., Su, B., Lee, H., Li, X., Perry, G., Smith, M. a, Zhu, X., 2009. Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 29, 9090–9103. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1357-09.2009>
- Wang, X., Su, B., Siedlak, S.L., Moreira, P.I., Fujioka, H., Wang, Y., Casadesus, G., Zhu, X., 2008b. Amyloid-beta overproduction causes abnormal mitochondrial dynamics via differential modulation of mitochondrial fission/fusion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 19318–19323. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804871105>
- Wen, Y., Miyashita, A., Kitamura, N., Tsukie, T., Saito, Y., Hatsuta, H., Murayama, S., Kakita, A., Takahashi, H., Akatsu, H., Yamamoto, T., Kosaka, K., Yamaguchi, H., Akazawa, K., Ihara, Y., Kuwano, R., 2013. SORL1 is genetically associated with neuropathologically characterized late-onset Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.* 35, 387–394. <https://doi.org/10.3233/JAD-122395>
- WHO, 2020. Dementia: A Public Health Priority [WWW Document]. URL <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia> (accessed 1.14.21).
- Wilhelm, B.G., Mandad, S., Truckenbrodt, S., Krohnert, K., Schafer, C., Rammner, B., Koo, S.J., Classen, G.A., Krauss, M., Haucke, V., Urlaub, H., Rizzoli, S.O., 2014. Composition of isolated synaptic boutons reveals the amounts of vesicle trafficking proteins. *Science* (80-). 344, 1023–1028. <https://doi.org/10.1126/science.1252884>
- Xu, S., Wang, P., Zhang, H., Gong, G., Gutierrez Cortes, N., Zhu, W., Yoon, Y., Tian, R., Wang, W., 2016. CaMKII induces permeability transition through Drp1 phosphorylation during chronic β -AR stimulation, in: *Nature Communications*. Nature Publishing Group, pp. 1–13. <https://doi.org/10.1038/ncomms13189>
- Yao, J., Irwin, R.W., Zhao, L., Nilsen, J., Hamilton, R.T., Brinton, R.D., 2009. Mitochondrial bioenergetic deficit precedes Alzheimer's pathology in female mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 14670–14675. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903563106>
- Yao, Y., Fan, X.L., Jiang, D., Zhang, Y., Li, X., Xu, Z. Bin, Fang, S. Bin, Chiu, S., Tse, H.F., Lian, Q., Fu, Q.L., 2018. Connexin 43-Mediated Mitochondrial Transfer of iPSC-MSCs Alleviates Asthma Inflammation. *Stem Cell Reports* 11, 1120–1135. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.09.012>
- Ye, S., Huang, Y., Müllendorff, K., Dong, L., Giedt, G., Meng, E.C., Cohen, F.E., Kuntz, I.D., Weisgraber, K.H., Mahley, R.W., 2005. Apolipoprotein (apo) E4 enhances amyloid β peptide production in cultured neuronal cells: ApoE structure as a potential therapeutic target. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 18700–18705. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508693102>
- Yin, R.H., Yu, J.T., Tan, L., 2015. The Role of SORL1 in Alzheimer's Disease. *Mol. Neurobiol.* <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8742-5>
- Zhang, B., Gao, Y., Li, Q., Sun, D., Dong, X., Li, X., Xin, W., Zhang, J., 2020. Effects of Brain-Derived Mitochondria on the Function of Neuron and Vascular Endothelial Cell After Traumatic Brain Injury. *World Neurosurg.* 138. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2019.11.172>
- Zhang, Z., Ma, Z., Yan, C., Pu, K., Wu, M., Bai, J., Li, Y., Wang, Q., 2019. Muscle-derived autologous mitochondrial transplantation: A novel strategy for treating cerebral ischemic injury. *Behav. Brain Res.* 356, 322–331. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.09.005>
- Zhao, Y., Jiang, Z., Delgado, E., Li, H., Zhou, H., Hu, W., Perez-Basterrechea, M., Janostakova, A., Tan, Q., Wang, J., Mao, M., Yin, Z., Zhang, Y., Li, Ying, Li, Q., Zhou, J., Li, Yunxiang, Revuelta, E.M., García-Gala, J.M., Wang, H., Perez-Lopez, S., Alvarez-Viejo, M., Menendez, E., Moss, T., Guindi, E., Otero, J., 2017. Platelet-derived mitochondria display embryonic stem cell markers and improve pancreatic islet b-cell function in humans. *Stem Cells Transl. Med.* 6, 1684–1697. <https://doi.org/10.1002/sctm.17->

Zhao, Z., Yu, Z., Hou, Y., Zhang, L., Fu, A., 2020. Improvement of cognitive and motor performance with mitotherapy in aged mice. *Int. J. Biol. Sci.* 16, 849–858. <https://doi.org/10.7150/ijbs.40886>

Zozina, V.I., Covantev, S., Goroshko, O.A., Krasnykh, L.M., Kukes, V.G., 2018. Coenzyme Q10 in Cardiovascular and Metabolic Diseases: Current State of the Problem. *Curr. Cardiol. Rev.* 14, 164–174. <https://doi.org/10.2174/1573403x14666180416115428>

ANEXOS (Artículos publicados)



Article

Age-Dependent Decline in Synaptic Mitochondrial Function Is Exacerbated in Vulnerable Brain Regions of Female 3xTg-AD Mice

César Espino de la Fuente-Muñoz¹, Mónica Rosas-Lemus², Perla Moreno-Castilla³ ,
Federico Bermúdez-Rattoni³ , Salvador Uribe-Carvajal² and Clorinda Arias^{1,*}

¹ Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, Mexico; cesarespinofm@hotmail.com

² Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, Mexico; monicarosaslemus@gmail.com (M.R.-L.); suribe@ifc.unam.mx (S.U.-C.)

³ Departamento de Neurociencia Cognitiva, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, Mexico; perla.moreno.castilla@gmail.com (P.M.-C.); bermudez@unam.mx (F.B.-R.)

* Correspondence: carias@unam.mx; Tel.: +52-55-56229215

Received: 13 July 2020; Accepted: 9 September 2020; Published: 19 November 2020



Abstract: Synaptic aging has been associated with neuronal circuit dysfunction and cognitive decline. Reduced mitochondrial function may be an early event that compromises synaptic integrity and neurotransmission in vulnerable brain regions during physiological and pathological aging. Thus, we aimed to measure mitochondrial function in synapses from three brain regions at two different ages in the 3xTg-AD mouse model and in wild mice. We found that aging is the main factor associated with the decline in synaptic mitochondrial function, particularly in synapses isolated from the cerebellum. Accumulation of toxic compounds, such as tau and A β , that occurred in the 3xTg-AD mouse model seemed to participate in the worsening of this decline in the hippocampus. The changes in synaptic bioenergetics were also associated with increased activation of the mitochondrial fission protein Drp1. These results suggest the presence of altered mechanisms of synaptic mitochondrial dynamics and their quality control during aging and in the 3xTg-AD mouse model; they also point to bioenergetic restoration as a useful therapeutic strategy to preserve synaptic function during aging and at the early stages of Alzheimer's disease (AD).

Keywords: synaptic mitochondria; brain aging; synaptosomes; mitochondrial dynamics; amyloid- β protein; tau

1. Introduction

Aging is associated with a variety of brain impairments that range from a slight decline in cognitive performance to severe memory loss and is the main risk factor for neurodegenerative diseases. In healthy aging, slowed neurotransmission and reduced synaptic plasticity have been reported [1–3]. However, not all brain regions are affected to the same extent during aging. For example, the cerebellum, hippocampus, and frontal cortex present a more evident volume reduction than other areas, possibly due to several factors, such as reduced dendritic branching, neuronal shrinkage, and synaptic loss [4,5]. In Alzheimer's disease (AD), synaptic terminal loss precedes neuronal death and is the best correlate with cognitive decline [6–10]. The mechanisms governing the particular susceptibility of synaptic endings to aging and neurodegeneration are only now becoming clear and indicate the participation of synaptic mitochondria as a central player [11]. Emerging evidence suggests

that reduced synaptic bioenergetics may be an early event that compromises neurotransmission and synaptic integrity in vulnerable brain regions [1,2,12,13].

Energy supply from mitochondria is essential to sustain metabolic demands and signaling functions at the synapses, making mechanisms that regulate mitochondrial biogenesis and dynamics a crucial area of study to understand how these processes participate in synaptic dysfunction in AD. Synaptic mitochondria arrive from the neuronal soma via anterograde transport mediated by a variety of proteins involved in mitochondrial maintenance and dynamics [14]. Through mitochondrial fusion, an exchange of mitochondrial contents occurs, which is essential to preserve mitochondrial energy capacity and for the distribution of these organelles in neurons [15]. Interestingly, mutation in the mitochondrial fusion gene *Mfn2* causes the neurodegenerative disease Charcot-Marie-Tooth disease [16]. Mitochondrial fission through dynamin-related protein 1 (*Drp1*) can help mitochondrial degradation in Parkin1-mediated mitophagy [17]. Recent work found a protective effect against amyloid toxicity on synapses and mitochondria by reducing the expression of *Drp1* [18,19]. This evidence strongly suggests the critical role of mitochondrial dynamics and their regulation by fission and fusion proteins to preserve mitochondrial activity in neurons and synapses.

A reduced number of mitochondria have been reported in the human brain with AD [20], as well as an imbalance in the contents of fusion/fission proteins [18,21–23]. Similarly, an increase in the fission protein *Fis1* is associated with a high rate of mitochondrial fragmentation in neuroblastoma cells that overexpress the mutated human amyloid precursor protein (*APP*) [24]. In the transgenic mouse model of AD overexpressing *APP/A β* , fragmented mitochondria with decreased activity of cytochrome oxidase C were also reported [25]. Furthermore, studies in isolated mitochondria from the triple transgenic mouse model (3xTg-AD) indicate bioenergetic dysfunction [26] similar to those found in the transgenic rat model that overexpressed mutated human *APP* [27]. There is a clearly emerging link between neurodegeneration and defects in mitochondrial dynamics and bioenergetics. Most of these studies were performed with neurons or mitochondria isolated from brain extract except for some recent work in synaptosomes isolated from brain cortices that reported mitochondrial dysfunction in aged 5xFAD mice [28].

Thus, to shed light on whether there is a relationship between aging and AD in mitochondrial synaptic dysfunction, we conducted experiments in isolated presynaptic terminals from three brain regions implicated in AD pathology from female 3xTg-AD mice and female wild-type (WT) mice at young and middle age, at which there are no substantial changes in presynaptic number but in synaptic functionality [7,8]. We analyzed the levels of proteins related to mitochondrial dynamics, mitochondrial bioenergetics, and mitochondrial ultrastructure. We found an important effect of aging; animals at 10 months but not 3 months old showed decreased mitochondrial bioenergetics that was slightly exacerbated in animals carrying the mutated proteins expressed in the 3xTg-AD 10-month-old mice. The observed changes consisted of a significant reduction in mitochondrial bioenergetics and mitochondrial membrane potential accompanied by an increase in the content of the activated form of *Drp1* and intramitochondrial accumulation of the *A β* peptide and tau protein.

2. Results

2.1. Evaluation of Mitochondrial Redox Capacity

The extent of MTT reduction was considered an index of synaptic viability and mitochondrial redox activity, as we previously described [29,30]. We first examined the age-dependent change in mitochondrial redox activity in synaptosomes isolated from the cerebral cortex, hippocampus, and cerebellum from young and aged WT and 3xTg-AD mice (Figure 1). As shown in Figure 1A, a significant decrease in MTT reduction in cortical synaptosomes was observed in young 3xTg-AD mice compared with young WT mice (40% inhibition) and in aged WT mice compared with aged 3xTg-AD mice (30% inhibition). A similar effect was also found in hippocampal synaptosomes from young and aged mice (53% inhibition) (Figure 1B). Finally, the synaptosomes isolated from the cerebellum, a region

that was not expected to accumulate AD-related markers, did not present significant differences between WT and 3xTg-AD at any age, but the basal MTT reduction capacity seemed to be lower in this region than in the hippocampus or cerebral cortex (Figure 1C).

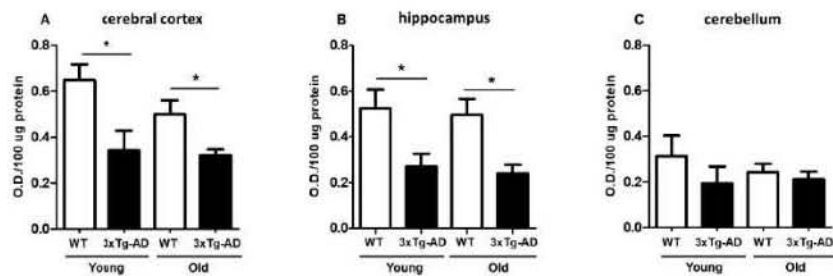


Figure 1. Mitochondrial redox capacity of synaptosomes. Synaptosomes were isolated from young and middle-aged female wild-type (WT) and 3xTg-AD mice and were assessed by MTT reduction after a 90 min incubation. Cortical synaptosomes (A), hippocampal synaptosomes (B) and cerebellar synaptosomes (C) are shown. Data are expressed as the mean percentage \pm SEM of duplicates from 3–4 different individual animals per group. Student's t test * $p < 0.05$.

2.2. Reduced Mitochondrial Bioenergetics Associated with Age

To evaluate the mitochondrial respiration rate at different ages, we measured basal oxygen consumption and respiratory coupled control in nonpermeabilized synaptosomes; then, we evaluated the effect of glucose addition and after exposure to the ATP synthase inhibitor oligomycin and the oxidative phosphorylation uncoupler FCCP. In the cerebral cortex, healthy synaptic mitochondria from young WT mice exhibited 8.0 nanomoles of basal O_2 consumption and 5.3 or 12.8 after oligomycin or FCCP treatment, respectively—very similar to that observed in young 3xTg-AD mice (6.9, 3.9 and 14.1, respectively). However, compared to WT young synaptosomes, synaptosomes from old WT mice showed significantly reduced oxygen consumption rates under the three tested conditions (3.5, 2.1 and 4, respectively). An additional and significant reduction was observed in synaptosomes from old 3xTg-AD mice compared with those from old WT mice (2.5, 1.62, and 3.3, respectively) (Figure 2A, Table 1). Synaptic mitochondria from the hippocampus presented a similar pattern of oxygen consumption to that observed in synaptic mitochondria from the cerebral cortex. In young animals, oxygen consumption was similar between WT and 3xTg-AD mice (9.8, 6.7, and 13 nmol O_2 in WT vs. 8.0, 6.7, and 12.9 in 3xTg-AD). Under all tested conditions, an important reduction in mitochondrial respiration was observed in synaptic mitochondria from aged WT mice compared with those from young WT mice, and this phenotype was further exacerbated in synaptosomes obtained from the 3xTg-AD animals (WT = 4.4, 3.5 and 7.1 vs. 3xTg-AD = 3.0, 1.6 and 5.1) (Figure 2B, Table 1). Synaptosomal mitochondria from the cerebellum of young animals showed similar responses, but a remarkable reduction in mitochondrial function was observed in synaptic mitochondria from old WT mice, with no further reduction observed in those from old 3xTg-AD mice (Figure 2C, Table 1). In the case of mitochondria from the cerebral cortex and hippocampus, a coupled pattern of oxygen consumption was observed, while synaptic mitochondria from the cerebellum seemed to be uncoupled at old age independent of the transgenic condition. To further study mitochondrial dysfunction, we also measured mitochondrial membrane potential using the Safranin O fluorescent probe. According to the bioenergetics results, we also found a significant reduction in this parameter in aged synaptosomes from the WT cerebral cortex and hippocampus (30% and 40%, respectively) that was more prominent in aged 3xTg-AD animals than in young 3xTg-AD animals (65% and 70%, respectively) (Figure 2D,E), suggesting compromised ATP production in synaptosomes from aged animals [31]. Similar to the effects revealed by the oxygen consumption experiments, the membrane potential of synaptosomal mitochondria isolated from the cerebellum was decreased by aging, and no further reduction was observed in old 3xTg-AD mice (Figure 2F).

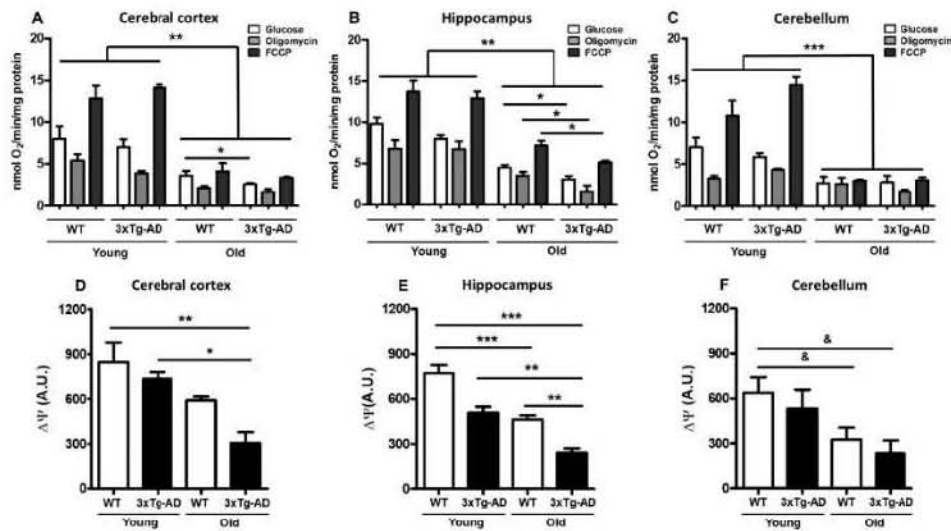


Figure 2. Age-related changes in oxygen consumption and mitochondrial membrane potential. Mitochondrial bioenergetics was measured in synaptosomes isolated from young and old female 3xTg-AD and WT mice. The oxygen consumption rate of cortical (A), hippocampal (B), and cerebellar (C) synaptosomes was measured in the presence of 10 mM glucose (white bar), 6 μ M oligomycin (gray bar), or 1 μ M FCCP (black bar). Values are expressed as nmol O₂/min/mg protein and are the mean percentage \pm SEM of duplicate measurements from 3 independent animals per group. Fluorescence changes in the mitochondrial membrane potential probe Safranin O in cortical (D), hippocampal (E), and cerebellar (F) synaptosomes are shown. Arbitrary units are the mean \pm SEM from triplicate measurements of 3–4 animals per group. ANOVA and Tukey's multiple comparison test, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Student's *t* test, & $p < 0.05$.

Table 1. Oxygen consumption of synaptosomes from cortex, hippocampus, and cerebellum of female WT and 3xTg-AD mice (nmol O₂/min/mg protein).

	Young		Old	
	WT	3xTg-AD	WT	3xTg-AD
Cortex				
Glucose	8.002	6.969	3.563 **	2.531 **&
Oligomycin	5.393	3.869	2.102 **	1.626 **
FCCP	12.800	14.130	4.093 **	3.318 **
Hippocampus				
Glucose	9.801	8.022	4.458 **	3.036 **&
Oligomycin	6.798	6.748	3.515 **	1.594 **&
FCCP	13.742	12.907	7.120 **	5.119 **&
Cerebellum				
Glucose	7.005	5.843	2.704 ***	2.787 ***
Oligomycin	3.258	4.277	2.601 ***	1.726 ***
FCCP	10.794	14.426	2.993 ***	3.070 ***

Key: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ relative to synaptosomes obtained from young WT mice and & $p < 0.05$ relative to synaptosomes from old WT mice.

2.3. Mitochondrial Fission Proteins Are Activated by Aging in 3xTg-AD Mice

As mitochondrial membrane depolarization disrupts the mitochondrial fusion/fission balance, we measured the total contents of the active form of the mitochondrial fission factor dynamin-related protein 1 (p-Drp1) and the fusion protein Mfn1. A slight increase in p-Drp1 occurred only in the aged

synaptosomes compared with the young synaptosomes from the cerebral cortex and hippocampus, and this effect was statistically significant in the aged 3xTg-AD mice in both regions (80% and 70%, respectively) (Figure 3A–C). To further analyze changes in mitochondrial dynamics, we examined whether mitofusin (Mfn1) from synaptosomes was affected by aging. Western blot experiments revealed high basal levels of this protein, but no significant changes were detected at any age in WT and 3xTg-AD mice (Figure 3D–F).

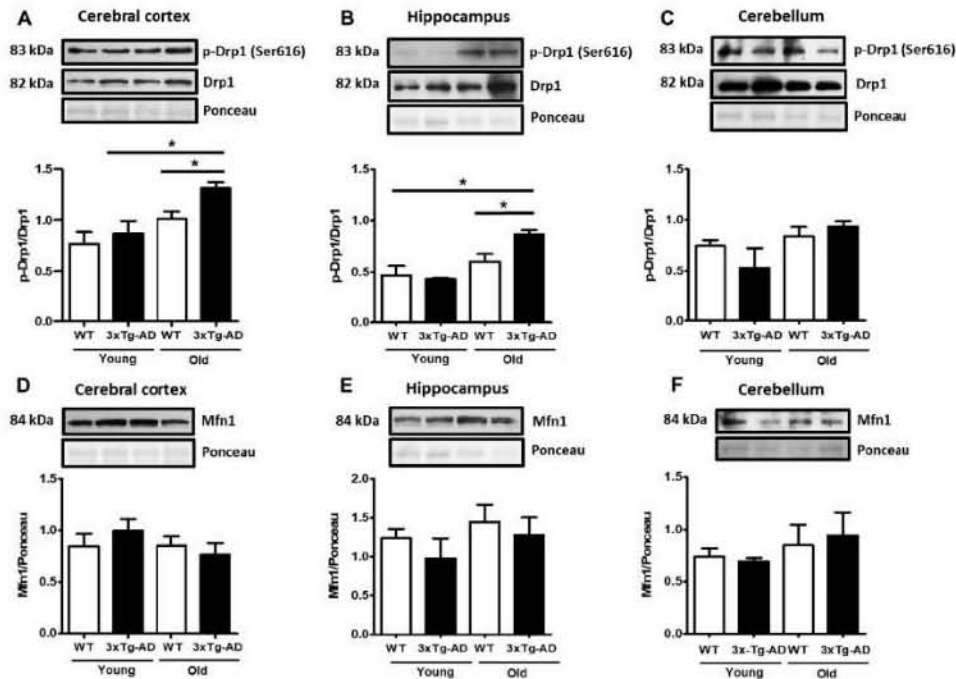


Figure 3. Changes in mitochondrial fission and fusion proteins. Representative Western blot and densitometric analysis of Drp1 and p-Drp1 in cortical (A), hippocampal (B), and cerebellar synaptosomes (C). The contents of Mfn1 in cortical (D), hippocampal (E), and cerebellar (F) samples are shown. Bars represent the densitometric analysis of proteins normalized to Drp1 or Poncaeu expression and represent the mean \pm SEM of 3–4 independent experiments. Student's t test * $p < 0.05$.

2.4. A β and Tau Accumulation in Synaptic Mitochondria

Based on the information that mitochondria may accumulate aggregated proteins, we decided to analyze morphological changes in synaptic mitochondria with age and the accumulation of A β and tau in 3xTg-AD mice in the most affected region in early stages of AD. In Figure 4, representative electron microscopy images of synaptosomes obtained from the hippocampus of old WT and 3xTg-AD mice are depicted and quantified (Figure 4E). As shown, synaptosomes from 3xTg-AD mice exhibited larger synaptic diameters and larger mitochondria than those from WT mice (Figure 4A–D). These changes can be clearly observed in the corresponding graphs (Figure 4F,G).

To further analyze whether synaptosomes from 3xTg-AD mice accumulate A β and tau in old age, we performed immunogold labeling experiments. We found a significant accumulation of immunogold particles bound to A β mainly localized inside synaptic mitochondria. No A β particles were observed in synaptosomes from WT mice (Figure 5, compare A with B and inset in C). Interestingly, few immunogold particles directed against tau protein were observed in WT animals (arrow), but prominent accumulation was evident in synaptosomes from old 3xTg-AD animals (Figure 5, compare D with E and inset in F).

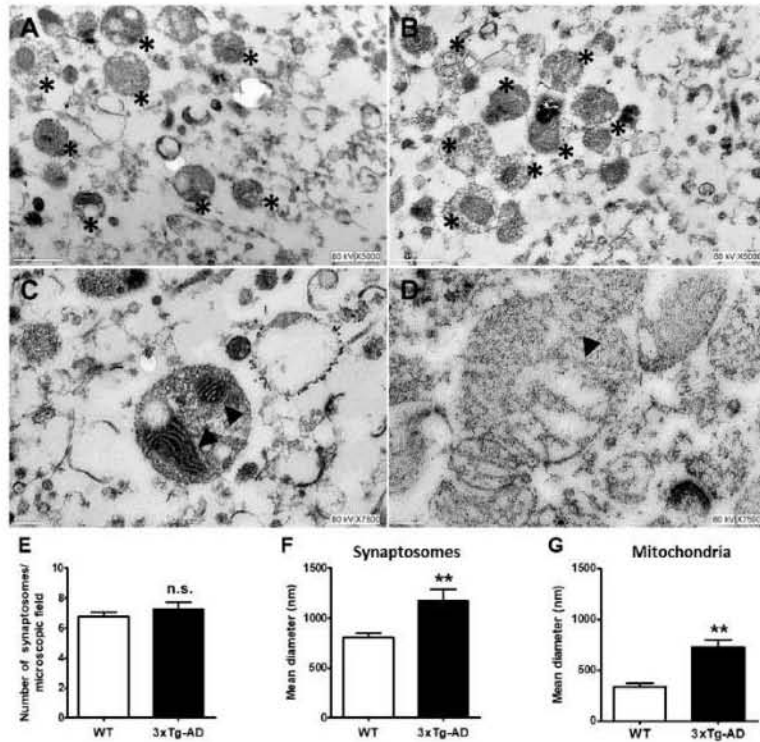


Figure 4. Ultrastructural changes in middle-aged hippocampal synaptosomes. Representative electron microscopy images of synaptosomes (*) from WT (A) and 3xT-AD mice (B). Changes in synaptic and mitochondria size in WT (C) and 3xTg-AD mice (D) are depicted. Mitochondria are marked with arrowheads. Bars represent the mean ± SEM of 3–4 synaptosomal random sections from each experimental condition from 3 independent experiments. Synaptosomes number (E), synaptosome diameter (F), and mitochondrial diameter (G). Scale bar = 200 nm. Student’s t test, ** $p < 0.01$; n.s. = no statistically significant difference.

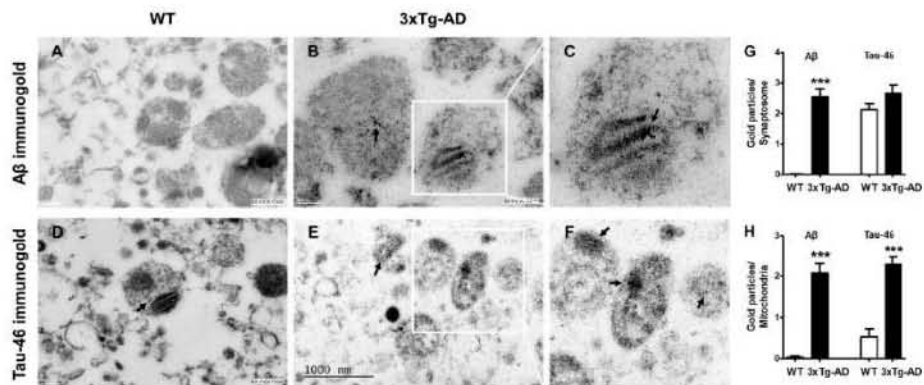


Figure 5. Increased accumulation of A β and tau in synaptosomes from middle-aged WT and 3xTg-AD mice. Representative immunogold electron microscopy images of A β 1-42 and tau labeled with a gold-conjugated antibody (12 nm size) demonstrating A β and tau accumulation (black arrows). Hippocampal synaptosomes from WT (A,D) and old female 3xTg-AD mice (B,E). (C,F) are magnifications of B,E. Quantification of immunogold particles is depicted (G,H). Student’s t test, *** $p < 0.001$.

3. Discussion

Altered mitochondrial function is thought to be an important factor associated with synaptic vulnerability during aging. However, it is not entirely understood whether a decline in the number and quality of mitochondria or if the accumulation of toxic molecules inside mitochondria are the main factors responsible for this decay.

Here, we reported that age is the main factor associated with the decline in synaptic mitochondrial function and that the accumulation of toxic compounds, such as tau and A β , that occur in the 3xTg-AD model may exacerbate this decline. It was noteworthy that the observed decay in synaptic mitochondrial function in wild-type mice seems to be prominent at the middle age correlating with the impairment of long-term potentiation (LTP) [8] and memory decline [32] without significant loss of presynaptic markers [7].

Another important finding was the observation that synaptosomes from the cerebellum are particularly vulnerable to the aging process, because no additional decay in mitochondrial function was observed in the transgenic animals, in accordance with the finding that few neurofibrillary tangles and amyloid plaques are present in this region, even in late AD [33,34]. Thus, we provide evidence supporting the notion that in cerebellar synaptic mitochondria, respiratory capacity and coupling control decline significantly with increasing age independent of the presence of AD-altered proteins. Similarly, several studies have shown that the cerebellum is highly susceptible to aging and is one of cerebral regions in which neuronal loss and significantly reduced synapse density have been reported in aged rats and humans [35,36]. The susceptibility of the cerebellum to age-related pathology has been demonstrated in a group of AD patients with the rare PS1-E280A mutation, which results in specific Purkinje cell loss and mitochondrial damage prior to A β accumulation [34], indicating that mitochondrial dysfunction is a central participant in the susceptibility of the cerebellum to aging and AD.

Additionally, we found that under basal conditions, mitochondrial respiratory capacity was similar in synaptosomes purified from young WT and transgenic animals (3 months old). In all cases, the oxygen consumption rate of intrasynaptosomal mitochondria was consistently reduced in the presence of oligomycin, and it was activated by the mitochondrial uncoupler of oxidative phosphorylation, FCCP, in the three brain regions. These results indicate that, in general, intrasynaptic mitochondrial function was normal and that the mitochondria were well coupled. However, in synaptosomes from old WT mice, a significant decline in the mitochondrial respiratory capacity and coupling control decline was observed, suggesting that altered synaptic bioenergetics is mainly associated with brain aging and that a reduction in oxygen consumption was probably associated with a reduced number of healthy mitochondria present in the aged synapse. In this sense, it has been proposed that during aging, a reduction in synaptic mitochondria may be the result of disrupted anterograde axonal transport, a condition that is exacerbated in AD due to microtubule destabilization [37,38]. Thus, mitochondrial functionality at the synapse depends not only on the presence of healthy mitochondria but also on the transport rate of these organelles from the neuronal body.

Abnormal mitochondrial dynamics is an early event linked to neurodegeneration. In particular, Drp1, a key fission protein, has been associated with AD progression [19,39–41]. We found that synaptic aging was accompanied by the increased expression of the activated form, p-Drp1, without significant changes in the total content of Drp1. This overexpression was exacerbated in synaptosomes from animals that accumulate A β and tau. We do not know which mechanism is involved in Drp1 activation by phosphorylation during aging, although one of the kinases involved in the Ser616 phosphorylation of this protein is the calcium-calmodulin-dependent kinase II (CaMKII) [42,43]. Considering that aging is associated with diverse defects in Ca²⁺ homeostasis (revised in [44]), it is plausible that Ca²⁺ overload at synapses could account for the activation of CaMKII and consequently the phosphorylation of Drp1. This is an interesting possibility to be analyzed in the future. In addition, several studies have reported that the interaction between Drp1 and A β and p-tau enhances GTPase-Drp1 enzymatic activity [22,45]. The consequence of Drp1 activation is mitochondrial fragmentation, which also involves the kinase

Pink1. Interestingly, the inhibition of Drp-1 ameliorates mitochondrial fragmentation and improves cognitive performance in the APP/PS1 transgenic model of AD [19]. Our results showed morphological changes consistent to mitochondrial swelling that do not exclude previous mitochondrial fragmentation. The mitochondrial changes observed in synaptosomes from the were similar to that observed in synaptosomes from the rat hippocampus exposed to A β and after internal Ca²⁺ mobilization [29].

The progressive dysfunction of mitochondria may also impact the synaptic accumulation of toxic proteins, because mitochondria possess the ability to sequester and degrade damaged proteins [46,47]. Thus, the decline in mitochondrial function in aging and in AD could contribute to diminished cellular proteostasis that exacerbates the accumulation of protein aggregates, as we have observed in mitochondria isolated from 3xTg-AD mice.

Data from the present study demonstrate the prominent role of aging in synaptic mitochondria vulnerability in different brain regions and the role of the associated pathological condition that exacerbates this damage in old individuals and that may further promote synaptic dysfunction. These data suggest that bioenergetic restoration maneuvers could be a useful therapeutic tool to preserve synaptic function during aging and at early the steps in AD.

4. Material and Methods

4.1. Animal Model

The female 3xTg-AD mice [48] and B6129SF2/J wild-type (<http://jaxmice.jax.org/strain/101045.html>) mice used in this study were 2–3 months old (3-month-old group; young) or 9–11 months old (10-month-old group; middle-aged) at which point the mice exhibited cognitive decline and expressed significant levels in AD markers, as reported by Belfiore and et al. [49]. Animals were handled with all precautions necessary to avoid suffering in agreement with the ARRIVE guidelines and Regulations for Research in Health Matters (México). The protocol was approved by the local Animal Care Committee (protocol number 179, approved on 11 November 1917). Mice were housed under a 12/12 h light/dark cycle with water and food ad libitum. To verify the homozygosity of the transgenic female mice, genotyping was carried out for each animal using the following primers: APP-tau, 5tauRev (5'-TCCAAAGTTCACCTGATAGT-3'); APP internal (5'-GCTTGCACCAGTTCTGGATGG-3'); Thy12.4 (5'-GAGGTATTCAGTCATGTGCT-3'). To amplify PS1, PS1-K13 (5'-CACACGCACACTCTGACATGCACAGGC-3') and PS1-K15 (5'-AGGCAGGAAGATCACGTGTTCCAAGTAC-3') were used.

4.2. Synaptosomal Preparation

At the appropriate age, the mice were sacrificed by decapitation, and the frontal cortex, hippocampus, and cerebellum were dissected. Synaptosomes were purified following the procedure described by Löscher et al. [50], with slight modifications [51]. In brief, the brain regions from both hemispheres were dissected on ice, homogenized in a solution containing 0.32 M sucrose, and centrifuged at 4500 rpm for 10 min (4 °C). The supernatant was carefully placed on 1 mL of 1.2 M sucrose and then centrifuged at 50,000 rpm (4 °C) for 20 min. The gradient interphase was carefully collected and diluted with 0.32 M sucrose to a final volume of 2 mL. The diluted suspension was then layered onto 1 mL of 0.8 M sucrose and centrifuged for 20 min at 50,000 rpm. This procedure yielded a synaptosomal pellet that was resuspended in 1 mL of Locke's solution containing (in mM) 154 NaCl, 5.6 KCl, 2.3 CaCl₂, 1 MgCl₂, 3.6 NaHCO₃, 5 glucose, and 5 HEPES, pH 7.2. Aliquots of 100 μ L of synaptosomes were incubated for 90 min at 37 °C in low K⁺ (5 mM) solution. Using this method, synaptosomes isolated from the cerebellum corresponded to the fraction called "small synaptosomes" that come mainly from granule cell synaptic contacts [52,53].

4.3. Evaluation of Mitochondrial Redox Activity in Synaptosomes

The method employed in the present study was previously described to evaluate metabolic activity in cultured cells through the MTT colorimetric assay that converts the tetrazolium

salt 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2-5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) to formazan crystals by oxidoreductase mitochondrial enzymes [54] and was modified from our previously described method [29]. The MTT compound was dissolved in phosphate-buffered saline (PBS) to a concentration of 5 mg/mL, and 10 μ L was added to 100 μ L of synaptosomes (90 μ g of protein) after 30 min and incubated for an additional 90 min. Then, synaptosomes were centrifuged, and the pellet was solubilized with 2-isopropanol acid (100 μ L). The resulting colored solution was quantified at 570 nm using a spectrophotometer (Pharmacia Biotech, Gaithersburg, MD, USA). The results are expressed as relative units of MTT reduction. Values are mean \pm SEM of 3–4 measurements made in duplicate.

4.4. Synaptosomal Mitochondria Bioenergetics

The oxygen consumption rate (OCR) of synaptic mitochondria was measured using a Strathkelvin 782 oximeter (Warner/Strathkelvin Instruments, Holliston, MA, USA) with a Clark-type electrode immersed in a 1 mL chamber with a PolyScience bath (Model 9000, Niles, IL, USA). In brief, synaptosomes were resuspended in 700 μ L of respiration buffer (100 mM trehalose, 10 mM KH_2PO_4 , 10 mM HEPES, 1 mM EGTA, 1.3 mM MgCl_2 , 1.2 mM Na_2SO_4 , 54 mM NaCl, 1 mg/mL bovine serum albumin (BSA), pH 7.2). Seventy-five microliters (approximately 70 μ g of protein) of synaptosomal solution from each brain region was diluted with 75 μ L of the respiration buffer. Oxygen consumption was measured in duplicate over 20 min under three different conditions: basal consumption in the presence of 10 mM glucose, 6 μ M oligomycin, an ATP synthase inhibitor, or 1 μ M carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP), a protonophore. The O_2 consumption in nmol/min/mg protein was calculated from the slope.

4.5. Mitochondrial Membrane Potential

Mitochondrial membrane potential was evaluated according to changes in Safranin O fluorescence at a wavelength of 495/586 nm (em-ex). All experiments were performed in 96-well plates. In each well, 75 μ L of respiration buffer (100 mM trehalose, 10 mM KH_2PO_4 , 10 mM HEPES, 1 mM EGTA, 1.3 mM MgCl_2 , 1.2 mM Na_2SO_4 , 1 mM NaCl/BSA 1 mg/mL) plus 1 μ M Safranin O were added and incubated for 10 min at 37 $^\circ\text{C}$. Subsequently, 75 μ L of synaptosomal solution (70 μ g total protein for cerebral cortex and cerebellum and 65 μ g for hippocampus) was added and incubated for 15 min at 37 $^\circ\text{C}$. At the end of this incubation, 1 μ M FCCP was added for an additional 40 min. The mitochondrial membrane potential was obtained by subtracting the fluorescence after decreasing the potential of the basal fluorescence.

4.6. Electrophoresis and Immunoblot

The total amount of synaptosomal protein was measured with a BioRad DCTM protein assay kit (Richmond, CA, USA). Twenty micrograms of protein were loaded in a 10% sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel and subsequently transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes. After 2 h of incubation in PBS/BSA, the blots were incubated with the fission protein antibody Drp1 (1:1000, Abcam, Cambridge, MA, USA), the activated form pS616-Drp1 (1:500, Cell Signaling, Danvers, MA, USA) or the fusion protein antibody Mfn1 (1:1000, Abcam, Cambridge, MA, USA). The antibodies were left overnight at 4 $^\circ\text{C}$, and then, the blots were washed three times with PBS-Tween 20 0.1% (10 min each). Then, the blots were incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies using an anti-rabbit IgG (1:12,000, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) or anti-mouse IgG (1:15,000, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) for 2 h at room temperature. The membranes were processed using the chemiluminescence ECL substrate (Millipore, Madison, WI, USA) and revealed with a Kodak X-Omat. The values obtained for each band were divided by the values obtained for Drp1 or ponceau staining, resulting in a ratio. Western blots bands were densitometrically analyzed by ImageJ software.

4.7. Electron Microscopy Analysis

Five hundred micrograms of synaptosomal protein from the hippocampus was centrifuged and the pellet was fixed in 3% glutaraldehyde, pH 7.4 for 30 min. At the end of this period, the pellet was rinsed in PBS and postfixed in 1% osmium tetroxide. Sections were embedded in epoxy resin and cut with a diamond knife (Ultracut Reichert Jung, Buffalo, NY, USA). For A β or tau immunogold labeling, the grid containing synaptosomes was carefully washed with distilled water and blocked with PBS/BSA 5%/horse serum 0.3% for 30 min at room temperature. The grids were incubated with 1 drop of anti-A β 1-42 (1:50, Millipore, Madison, WI, USA) or anti-tau (Tau-46 1:50, Cell Signaling, Danvers, MA, USA) overnight at 4 °C. Then, the grids were washed 3 times with PBS and incubated with the secondary anti-mouse IgG-gold (1:30, particle size 12 nm, Abcam, Cambridge, MA, USA) for 1 h at room temperature. At the end of this period, the grids were washed with distilled water, stained with uranyl acetate, and observed under a transmission electron microscope (JEOL 1200 EX-II, Peabody, MA, USA). For each age group, 2–3 different animals were analyzed, and 3 micrographs (8000 \times and 25,000 \times) showing 3–4 synaptosomal sections from each individual from each experimental condition were randomly chosen.

4.8. Statistical Analysis

The results are expressed as the mean \pm SEM. Comparisons between groups were performed using unpaired Student's t test or ANOVA followed by Tukey's test, as indicated in each figure legend. $p < 0.05$, $p < 0.01$, or $p < 0.001$ was considered significant. GraphPad Prism 5.01 (San Diego, CA, USA) was used for graphics and statistical analysis.

Author Contributions: C.A. conceived, designed, and coordinated the study. C.E.d.l.F.-M. performed the experiments and data analysis. P.M.-C. provided study material and edited the paper. M.R.-L. conducted part of the experiments. F.B.-R. provided expertise and resources and edited the paper. S.U.-C. provided expertise and supervised mitochondrial bioenergetic studies. C.A. and C.E.d.l.F.-M. wrote and edited the paper. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by Fundación Miguel Alemán, A.C.; UNAM, DGAPA, PAPIIT grant number, IN202318, and CONACYT grant number, A1-S9559. C.E. d.l.F.-M is a doctoral student from Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received a fellowship from CONACYT (573559).

Acknowledgments: The authors thank the technical assistance of Patricia Ferrera.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Morrison, J.H.; Baxter, M.G. The ageing cortical synapse: Hallmarks and implications for cognitive decline. *Nat. Rev. Neurosci.* **2012**, *13*, 240–250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Morrison, J.H.; Baxter, M.G. Synaptic health. *JAMA Psychiatry* **2014**, *71*, 835–837. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Petralia, R.S.; Mattson, M.P.; Yao, P.J. Communication breakdown: The impact of ageing on synapse structure. *Ageing Res. Rev.* **2014**, *14*, 31–42. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Burke, S.N.; Barnes, C.A. Neural plasticity in the ageing brain. *Nat. Rev. Neurosci.* **2006**, *7*, 30–40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Pannese, E. Morphological changes in nerve cells during normal aging. *Brain Struct. Funct.* **2011**, *216*, 85–89. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- DeKosky, S.T.; Scheff, S.W. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: Correlation with cognitive severity. *Ann. Neurol.* **1990**, *27*, 457–464. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Hong, S.; Beja-Glasser, V.F.; Nfonoyim, B.M.; Frouin, A.; Li, S.; Ramakrishnan, S.; Merry, K.M.; Shi, Q.; Rosenthal, A.; Barres, B.A.; et al. Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science* **2016**, *352*, 712–716. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Moreno-Castilla, P.; Rodriguez-Duran, L.F.; Guzman-Ramos, K.; Barcenas-Femat, A.; Escobar, M.L.; Bermudez-Rattoni, F. Dopaminergic neurotransmission dysfunction induced by amyloid- β transforms cortical long-term potentiation into long-term depression and produces memory impairment. *Neurobiol. Aging* **2016**, *41*, 187–199. [[CrossRef](#)]

9. Mucke, L.; Selkoe, D.J. Neurotoxicity of amyloid β -protein: Synaptic and network dysfunction. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2012**, *2*, a006338. [[CrossRef](#)]
10. Selkoe, D.J. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* **2002**, *298*, 789–791. [[CrossRef](#)]
11. Li, Z.; Okamoto, K.L.; Hayashi, Y.; Sheng, M. The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. *Cell* **2004**, *119*, 873–887. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Scheff, S.W.; Price, D.A. Synaptic pathology in Alzheimer's disease: A review of ultrastructural studies. In Proceedings of the Neurobiology of Aging. *Neurobiol. Aging* **2003**, *24*, 1029–1046. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Gillingwater, T.H.; Wishart, T.M. Mechanisms underlying synaptic vulnerability and degeneration in neurodegenerative disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **2013**, *39*, 320–334. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Devine, M.J.; Kittler, J.T. Mitochondria at the neuronal presynapse in health and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **2018**, *19*, 63–80. [[CrossRef](#)]
15. Chen, H.; McCaffery, J.M.; Chan, D.C. Mitochondrial Fusion Protects against Neurodegeneration in the Cerebellum. *Cell* **2007**, *130*, 548–562. [[CrossRef](#)]
16. Züchner, S.; Mersiyanova, I.V.; Muglia, M.; Bissar-Tadmouri, N.; Rochelle, J.; Dadali, E.L.; Zappia, M.; Nelis, E.; Patitucci, A.; Senderek, J.; et al. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat. Genet.* **2004**, *36*, 449–451. [[CrossRef](#)]
17. Tanaka, A.; Cleland, M.M.; Xu, S.; Narendra, D.P.; Suen, D.F.; Karbowski, M.; Youle, R.J. Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin. *J. Cell Biol.* **2010**, *191*, 1367–1380. [[CrossRef](#)]
18. Manczak, M.; Kandimalla, R.; Fry, D.; Sesaki, H.; Reddy, P.H. Protective effects of reduced dynamin-related protein 1 against amyloid beta-induced mitochondrial dysfunction and synaptic damage in Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.* **2016**, *25*, 5148–5166. [[CrossRef](#)]
19. Baek, S.H.; Park, S.J.; Jeong, J.I.; Kim, S.H.; Han, J.J.-W.W.; Kyung, J.W.; Baik, S.-H.H.; Choi, Y.; Choi, B.Y.; Park, J.S.; et al. Inhibition of Drp1 Ameliorates Synaptic Depression, A β Deposition, and Cognitive Impairment in an Alzheimer's Disease Model. *J. Neurosci.* **2017**, *37*, 5099–5110. [[CrossRef](#)]
20. Hirai, K.; Aliev, G.; Nunomura, A.; Fujioka, H.; Russell, R.L.; Atwood, C.S.; Johnson, A.B.; Kress, Y.; Vinters, H.V.; Tabaton, M.; et al. Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **2001**, *21*, 3017–3023. [[CrossRef](#)]
21. Wang, X.; Su, B.; Lee, H.-G.H.; Li, X.; Perry, G.; Smith, M.A.; Zhu, X. Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **2009**, *29*, 9090–9103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Manczak, M.; Calkins, M.J.; Reddy, P.H. Impaired mitochondrial dynamics and abnormal interaction of amyloid beta with mitochondrial protein Drp1 in neurons from patients with Alzheimer's disease: Implications for neuronal damage. *Hum. Mol. Genet.* **2011**, *20*, 2495–2509. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Reddy, P.H.; Tripathi, R.; Troung, Q.; Tirumala, K.; Reddy, T.P.; Anekonda, V.; Shirendeb, U.P.; Calkins, M.J.; Reddy, A.P.; Mao, P.; et al. Abnormal mitochondrial dynamics and synaptic degeneration as early events in Alzheimer's disease: Implications to mitochondria-targeted antioxidant therapeutics. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1822*, 639–649. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Wang, X.; Su, B.; Siedlak, S.L.; Moreira, P.I.; Fujioka, H.; Wang, Y.; Casadesus, G.; Zhu, X. Amyloid-beta overproduction causes abnormal mitochondrial dynamics via differential modulation of mitochondrial fission/fusion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 19318–19323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Du, H.; Guo, L.; Yan, S.; Sosunov, A.A.; McKhann, G.M.; Yan, S.S. Early deficits in synaptic mitochondria in an Alzheimer's disease mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 18670–18675. [[CrossRef](#)]
26. Yao, J.; Irwin, R.W.; Zhao, L.; Nilsen, J.; Hamilton, R.T.; Brinton, R.D. Mitochondrial bioenergetic deficit precedes Alzheimer's pathology in female mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 14670–14675. [[CrossRef](#)]
27. Adami, P.V.M.; Quijano, C.; Magnani, N.; Galeano, P.; Evelson, P.; Cassina, A.; Do Carmo, S.; Leal, M.C.; Castaño, E.M.; Cuello, A.C.; et al. Synaptosomal bioenergetic defects are associated with cognitive impairment in a transgenic rat model of early Alzheimer's disease. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2017**, *37*, 69–84. [[CrossRef](#)]
28. Wang, L.; Guo, L.; Lu, L.; Sun, H.; Shao, M.; Beck, S.J.; Li, L.; Ramachandran, J.; Du, Y.; Du, H. Synaptosomal mitochondrial dysfunction in 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0150441. [[CrossRef](#)]
29. Mungarro-Menchaca, X.; Morán, P.F.J.; Clorinda, A. β -amyloid peptide induces ultrastructural changes in synaptosomes and potentiates mitochondrial dysfunction in the presence of ryanodine. *J. Neurosci. Res.* **2002**, *68*, 89–96. [[CrossRef](#)]

30. Quiroz-Baez, R.; Flores-Domínguez, D.; Arias, C. Synaptic aging is associated with mitochondrial dysfunction, reduced antioxidant contents and increased vulnerability to amyloid- β toxicity. *Curr. Alzheimer Res.* **2013**, *10*, 324–331. [[CrossRef](#)]
31. Nicholls, D.G. Mitochondrial membrane potential and aging. *Aging Cell* **2004**, *3*, 35–40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Gower, A.J.; Lambert, Y. The aged mouse as a model of cognitive decline with special emphasis on studies in NMRI mice. *Behav. Brain Res.* **1993**, *57*, 163–173. [[CrossRef](#)]
33. Mavroudis, I.A.; Fotiou, D.F.; Adipepe, L.F.; Manani, M.G.; Njau, S.D.; Psaroulis, D.; Costa, V.G.; Baloyannis, S.J. Morphological changes of the human purkinje cells and deposition of neuritic plaques and neurofibrillary tangles on the cerebellar cortex of Alzheimer's disease. *Am. J. Alzheimers. Dis. Other Dement.* **2010**, *25*, 585–591. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Sepulveda-Falla, D.; Barrera-Ocampo, A.; Hagel, C.; Korwitz, A.; Vinuesa-Veloz, M.F.; Zhou, K.; Schonewille, M.; Zhou, H.; Velazquez-Perez, L.; Rodriguez-Labrada, R.; et al. Familial Alzheimer's disease-associated presenilin-1 alters cerebellar activity and calcium homeostasis. *J. Clin. Investig.* **2014**, *124*, 1552–1567. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Andersen, B.B.; Gundersen, H.J.G.; Pakkenberg, B. Aging of the Human Cerebellum: A Stereological Study. *J. Comp. Neurol.* **2003**, *466*, 356–365. [[CrossRef](#)]
36. Rogers, J.; Zornetzer, S.F.; Bloom, F.E.; Mervis, R.E. Senescent microstructural changes in rat cerebellum. *Brain Res.* **1984**, *292*, 23–32. [[CrossRef](#)]
37. Stamer, K.; Vogel, R.; Thies, E.; Mandelkow, E.; Mandelkow, E.M. Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. *J. Cell Biol.* **2002**, *156*, 1051–1063. [[CrossRef](#)]
38. Morfini, G.; Pigino, G.; Beffert, U.; Busciglio, J.; Brady, S.T. Fast axonal transport misregulation and Alzheimer's disease. *NeuroMol. Med.* **2002**, *2*, 89–99. [[CrossRef](#)]
39. Wang, X.; Su, B.; Fujioka, H.; Zhu, X. Dynamin-like protein 1 reduction underlies mitochondrial morphology and distribution abnormalities in fibroblasts from sporadic Alzheimer's disease patients. *Am. J. Pathol.* **2008**, *173*, 470–482. [[CrossRef](#)]
40. Cho, D.-H.; Nakamura, T.; Fang, J.; Cieplak, P.; Godzik, A.; Gu, Z.; Lipton, S. S-Nitrosylation of Drp1 Mediates β -Amyloid: Related Mitochondrial Fission and Neuronal Injury. *Science* **2009**, *324*, 102–105. [[CrossRef](#)]
41. Kandimalla, R.; Reddy, P.H. Multiple faces of dynamin-related protein 1 and its role in Alzheimer's disease pathogenesis. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Basis Dis.* **2016**, *1862*, 814–828. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Xu, S.; Wang, P.; Zhang, H.; Gong, G.; Gutierrez Cortes, N.; Zhu, W.; Yoon, Y.; Tian, R.; Wang, W. CaMKII induces permeability transition through Drp1 phosphorylation during chronic β -AR stimulation. In Proceedings of the Nature Communications; Nature Publishing Group: Berlin, Germany, 2016; Volume 7, pp. 1–13.
43. Divakaruni, S.S.; Van Dyke, A.M.; Chandra, R.; LeGates, T.A.; Contreras, M.; Dharmasri, P.A.; Higgs, H.N.; Lobo, M.K.; Thompson, S.M.; Blanpied, T.A. Long-Term Potentiation Requires a Rapid Burst of Dendritic Mitochondrial Fission during Induction. *Neuron* **2018**, *100*, 860–875.e7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Nikolettou, V.; Tavernarakis, N. Calcium homeostasis in aging neurons. *Front. Genet.* **2012**, *3*, 200. [[CrossRef](#)]
45. Manczak, M.; Reddy, P.H. Abnormal interaction between the mitochondrial fission protein Drp1 and hyperphosphorylated tau in Alzheimer's disease neurons: Implications for mitochondrial dysfunction and neuronal damage. *Hum. Mol. Genet.* **2012**, *21*, 2538–2547. [[CrossRef](#)]
46. Bender, T.; Lewrenz, I.; Franken, S.; Baitzel, C.; Voos, W. Mitochondrial enzymes are protected from stress-induced aggregation by mitochondrial chaperones and the Pim1/LON protease. *Mol. Biol. Cell* **2011**, *22*, 541–554. [[CrossRef](#)]
47. Ruan, L.; Zhou, C.; Jin, E.; Kucharavy, A.; Zhang, Y.; Wen, Z.; Florens, L.; Li, R. Cytosolic proteostasis through importing of misfolded proteins into mitochondria. *Nature* **2017**, *543*, 443–446. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Oddo, S.; Caccamo, A.; Shepherd, J.D.; Murphy, M.P.; Golde, T.E.; Kaye, R.; Metherate, R.; Mattson, M.P.; Akbari, Y.; LaFerla, F.M. Triple-transgenic model of Alzheimer's Disease with plaques and tangles: Intracellular A β and synaptic dysfunction. *Neuron* **2003**, *39*, 409–421. [[CrossRef](#)]
49. Belfiore, R.; Rodin, A.; Ferreira, E.; Velazquez, R.; Branca, C.; Caccamo, A.; Oddo, S. Temporal and regional progression of Alzheimer's disease-like pathology in 3xTg-AD mice. *Aging Cell* **2019**, *18*, e12873. [[CrossRef](#)]

50. Löscher, W.; Böhme, G.; Müller, F.; Pagliusi, S.; Loscher, W.; Bohme, G.; Muller, F.; Pagliusi, S. Improved method for isolating synaptosomes from 11 regions of one rat brain: Electron microscopic and biochemical characterization and use in the study of drug effects on nerve terminal gamma-aminobutyric acid in vivo. *J. Neurochem.* **1985**, *45*, 879–889. [[CrossRef](#)]
51. Quiroz-Baez, R.; Ferrera, P.; Rosendo-Gutiérrez, R.; Morán, J.; Bermúdez-Rattoni, F.; Arias, C. Caspase-12 activation is involved in amyloid- β protein-induced synaptic toxicity. *J. Alzheimer's Dis.* **2011**, *26*, 467–476. [[CrossRef](#)]
52. Israël, M.; Whittaker, V.P. The isolation of mossy fibre endings from the granular layer of the cerebellar cortex. *Experientia* **1965**, *21*, 325–326. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Ferrari, F.; Gorini, A.; Villa, R.F. Energy metabolism of synaptosomes from different neuronal systems of rat cerebellum during aging: A functional proteomic characterization. *Neurochem. Res.* **2015**, *40*, 172–185. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55–63. [[CrossRef](#)]

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

César Espino De la Fuente-Muñoz and Clorinda Arias*

The therapeutic potential of mitochondrial transplantation for the treatment of neurodegenerative disorders

<https://doi.org/10.1515/revneuro-2020-0068>

Received July 8, 2020; accepted September 29, 2020;

published online December 7, 2020

Abstract: Mitochondrial activity is essential to support neural functions, and changes in the integrity and activity of the mitochondria can contribute to synaptic damage and neuronal death, especially in degenerative diseases associated with age, such as Alzheimer's and Parkinson's disease. Currently, different approaches are used to treat these conditions, and one strategy under research is mitochondrial transplantation. For years, mitochondria have been shown to be transferred between cells of different tissues. This process has allowed several attempts to develop transplantation schemes by isolating functional mitochondria and introducing them into damaged tissue in particular to counteract the harmful effects of myocardial ischemia. Recently, mitochondrial transfer between brain cells has also been reported, and thus, mitochondrial transplantation for disorders of the nervous system has begun to be investigated. In this review, we focus on the relevance of mitochondria in the nervous system, as well as some mitochondrial alterations that occur in neurodegenerative diseases associated with age. In addition, we describe studies that have performed mitochondrial transplantation in various tissues, and we emphasize the advances in mitochondrial transplantation aimed at treating diseases of the nervous system.

Keywords: bioenergetic restoration; mitochondrial transplant; neurodegenerative diseases; neuronal survival.

*Corresponding author: Clorinda Arias, Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70-228, 04510, Ciudad de México, México, E-mail: carias@unam.mx
César Espino De la Fuente-Muñoz, Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70-228, 04510, Ciudad de México, México

Introduction

Mitochondria occupy up to 20% of the cytoplasmic volume and are highly dynamic organelles that constantly change their shape and location in the cell through fission, fusion, and transport events (Schwarz 2013; Suen et al. 2008). In addition to their well-known role in energy production, mitochondria also enhance or decrease diverse cellular processes involved in survival and apoptosis, calcium handling, cellular signaling (Chandel 2014; Giorgi et al. 2012; Picard and McEwen 2014; Scott and Youle 2010), and degradation of misfolding proteins (Ruan et al. 2017).

Along with the maintenance of basic cellular mechanisms, mitochondria are fundamental in neurons, which have high rates of energy consumption used for neurotransmission and plasticity events that support higher brain functions (Erecinska et al. 2004; Rangaraju et al. 2014; Silver and Erecinska 1998). During neurotransmission, presynaptic mitochondria provide adenosine triphosphate (ATP) for the synthesis and storage of neurotransmitters (Sarter and Parikh 2005), synaptic vesicle recycling (Murthy and Camilli 2003; Verstreken et al. 2005), maintenance of ionic gradients, and preservation of intracellular Ca^{2+} homeostasis (Gureev et al. 2020; Levy et al. 2003; Rizzuto 2001; Zorov et al. 2014). In fact, it was proposed that changes in mitochondrial functionality were strongly linked to human brain growth, allowing cognitive evolution. This perspective has received attention by the finding of ancient mutations in mitochondrial genes that increased the energy production available for brain growth and the establishment of the highly specialized brain functions (Grossman et al. 2004; Khamsi 2004; Pontzer et al. 2016).

Neurons have a complex morphology with long neurites that require the distribution and transport of mitochondria throughout their arbors. Areas of high ATP demand, such as the axonal growth cone and presynaptic terminals, contain more mitochondria than other regions in the neuron (Nguyen et al. 1997; Perkins et al. 2010; Smith and Gallo 2018). Although mitochondrial biogenesis can occur in the axons, it is thought that most of the mitochondria are generated in the soma, which requires specific and active mechanisms to distribute them to distal areas.

According to Sun et al. (2013), 30% of axonal mitochondria are motile, allowing their transport to synapses. Thus, regulated transport, fusion–fission, and anchoring of mitochondria to the synapses are critical to maintain mitochondrial quantity and quality in neurons (Chen and Chan 2009; Lin and Sheng 2015; Mandal and Drerup 2019; Zheng et al. 2019). These events are mainly mediated by kinesins for anterograde movement, dynein for retrograde movement, and various coupling proteins. Among these proteins, the Rho GTPase, Miro/Milton, and syntaphilin (Saxton and Hollenbeck 2012) serve as anchored proteins that recruit mitochondria to active synapses (Kang et al. 2008). Thus, dysfunction of mitochondrial quality control has been identified a focal point of several neurological diseases (Burté et al. 2015; Chen et al. 2007; Golpich et al. 2017; Rangaraju et al., 2019b; Youle and van der Bliek 2012).

These evidences point to the fine balance that controls mitochondrial dynamics in neurons and the complex role of mitochondrial function in the brain. In this review, we summarize diverse studies showing the impact of healthy mitochondrial populations to sustain brain activity and neuronal survival. Then, we emphasize the recent advances in mitochondrial transplantation strategies aimed at treating diseases of the nervous system in *in vivo* and *in vitro* models of neuronal injury.

Mitochondria, neuronal plasticity, and cognition

Several studies have documented the role of mitochondria in the establishment of long-term potentiation (LTP), which is thought to be one of the cellular mechanisms underlying learning and memory. In general, LTP involves the strengthening of preexisting dendritic spines and the formation of new neuronal contacts; mitochondrial distribution in synapses contributes to both processes (Todorova and Blokland 2016). LTP induction causes a rapid burst of mitochondrial fission in dendrites induced by Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II and Drp1 phosphorylation, suggesting that increased mitochondrial fission regulates plasticity events (Divakaruni et al. 2018). Furthermore, the number of dendritic spines containing mitochondria increases when the spines are growing or when neurons undergo repeated depolarization with KCl (Li et al. 2004). Recently, it was shown that synaptic plasticity depends on local protein translation that is powered by dendritic mitochondria serving as spatially confined energy reserves (Rangaraju et al. 2019a). Similarly, a relationship between mitochondrial dysfunction

and impairment in spatial memory and cognitive deficits in mice has been associated with the presence of more than one mtDNA type known as heteroplasmy, which produces deficiencies in mitochondrial complex IV activity (Sharpley et al. 2012; Tanaka et al. 2008).

A relationship among mitochondrial morphology, cognitive function, and aging has also been demonstrated, since synaptosomes from aged monkeys have numerous donut-shaped mitochondria, which is indicative of mitochondrial stress (Ahmad et al. 2013; Hara et al. 2014). This altered mitochondrial morphology correlated with reduced working memory, synapse loss, and a decreased number of synaptic vesicles, suggesting that the morphological changes impact mitochondrial functionality and influence the decline of cognitive performance during aging (Hara et al. 2014). Mitochondrial quality control is also involved in cognitive performance. Parkin kinase 1 (PINK1), which regulates mitophagy, has positive effects on learning and memory, and its genetic ablation led to dysfunction in the execution of cognitive tasks (Du et al. 2017). Supporting this conclusion, mitophagy stimulation was shown to reverse the memory impairment observed in models of Alzheimer's disease (Fang et al. 2019). The data mentioned are some examples of the growing evidence for the relevance of mitochondrial function through its role in energy production, sustaining neurotransmission, Ca^{2+} buffering, and signaling pathway activation, which are essential for synaptic plasticity and brain cognition. Thus, disturbed mitochondrial function during aging and in several neurodegenerative diseases may be associated with cognitive decline and memory loss, as shown in the following evidence.

Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases associated with aging

Several works have indicated that mitochondrial pathology is a central aspect of neurodegenerative diseases, including Parkinson's disease (PD) (Poewe et al. 2017) and Alzheimer's disease (AD) (Querfurth and LaFerla 2010). Postmortem studies have found a significant decrease in mitochondrial complex I and complex II activity in PD patients (Grünewald et al. 2016), along with other studies in animal models using mitochondrial toxins such as 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) to reproduce many aspects of this disease (Jagmag et al. 2016). The α -synuclein protein, which generates oxidative stress through excessive accumulation in the mitochondria, alters mitochondrial dynamics and mitochondrial

damage associated with this disease (Devi et al. 2008; Nakamura et al. 2011, 2008). The Parkin/PINK1 pathway is essential in mitochondrial dynamics and mitophagy (Scarffe et al. 2014), and interestingly, Parkin mutations are the most frequent cause of autosomal-recessive PD (Kitada et al. 1998; Park et al. 2018). The development of animal models of Parkin deficiency has further shown that deficient mitochondrial quality control contributes to neuronal dysfunction and neurodegeneration (Pickrell et al. 2015).

Also, in the brain of AD patients, mitochondria number, mitochondrial crests, and the levels of mitochondrial proteins that give rise to mitochondrial fusion were decreased, while the proteins regulating mitochondrial fission were increased (Hirai et al. 2001; Manczak et al. 2011; Wang et al. 2009). In neuronal cells overexpressing APP mutants related to familial AD, there was an increase in the mitochondrial protein Fis1 and mitochondrial fragmentation, in addition to a delay in the fusion process and a change in the mitochondrial distribution toward the perinuclear zone (Wang et al. 2008). Furthermore, altered brain energetics induced mitochondrial fission arrest in AD patients and in animal models of familial AD (Zhang et al. 2016). Bioenergetic dysfunction was also observed in isolated mitochondria from 3xTg-AD mice (Yao et al. 2009), as well as increased mitochondrial permeability; a decline in respiratory function and oxidative stress in the transgenic mAPP mice (Du et al. 2010), similar to those found in the transgenic rat model that overexpressed mutated human APP (Adami et al. 2017). An imbalance in mitochondrial dynamics and the mitochondrial membrane potential was prominent in the 5xFAD transgenic mice (Wang et al. 2016). Mitochondrial involvement in AD pathology is also supported by the finding that the inhibition of Drp-1 prevented excessive mitochondrial fragmentation, decreased the loss of mitochondrial membrane potential, reduced A β peptide deposition, and improved cognitive behavior in an AD model (Baek et al. 2017). Mitochondria can import many proteins to the cytosol, and some of them are cleaved by the matrix protein peptidase PreP (Alikhani et al. 2009; Falkevall et al. 2006). The A β peptide can be transported to mitochondria, and its accumulation decreases the activity of PreP, leading to a failure in the protein degradation machinery and an imbalance in the mitochondrial proteome (Alikhani et al. 2011; Mossmann et al. 2014). Pathological forms of the tau protein have also been implicated in mitochondrial toxicity in animal models of AD; in fact, when Drp-1 expression was reduced, mitochondrial function improved in these transgenic mice carrying a mutated form of tau (Kandimalla et al. 2016).

Some of this evidence indicates the prominent involvement of mitochondria in age-related neuropathologies and

suggests the therapeutic potential of restoration of mitochondrial functionality through mitochondrial transplantation to prevent the development or to slow the progression of these disabling disorders. This therapeutic strategy has been considered because the mitochondrial exchange between cells seems to occur frequently in different tissues and for different purposes. Recently, mitochondrial transplantation has received much attention for its potential role in improving neuronal function and due to several efforts to replace damaged mitochondria with healthy mitochondria through diverse transplantation paradigms.

Mitochondrial transfer mechanisms

In general, the naturally occurring mitochondrial transfer involves the incorporation of functional mitochondria into the mitochondrial network from one donor cell to a recipient cell to improve cellular bioenergetics or as a mechanism for mitochondrial disposal. Evidence has shown that mitochondrial transfer occurs physiologically, but it is exacerbated during injury in mammalian cells (Berridge et al. 2016). In an *in vivo* model of lipopolysaccharide (LPS)-induced pulmonary injury, mitochondria derived from bone marrow stem cells were actively transported to pulmonary epithelial cells, rescuing respiration and cellular ATP levels (Islam et al. 2012). Furthermore, *ex vivo* studies established that platelet-releasing mitochondria can be taken up by pancreatic β -cells, leading to the proliferation and enhancement of islet β -cell function (Zhao et al. 2017). Early work reported that mtDNA can also be released and taken up by cells to restore mitochondrial function. For example, cells lacking mtDNA (p^0) were able to improve their aerobic respiration after being incubated with normal progenitor cells from the bone marrow (Spees et al. 2006).

In the nervous system, mitochondrial transfer through a phenomenon called transmitophagy was also observed. This process involves the formation of protuberances in the neuronal axons of the optic nerve, which contain damaged mitochondria that are released and captured by astrocytes for their degradation (Davis et al. 2014). Astrocytes can also donate functional mitochondria to neurons after glucose and oxygen deprivation to provide neuroprotection (Hayakawa et al. 2016).

To date, at least three main mechanisms have been found for mitochondrial exchange between cells: the formation of tunneling nanotubes (TNTs), vesicle-mediated transport, and cellular fusion, although the latter rarely

occurs naturally (Murray and Krasnodembskaya 2019; Torralba et al. 2016). TNTs represent dynamic connections (Dupont et al. 2018) and are extensions of the actin cytoskeleton that form communicating channels between cells with an approximate diameter between 50 and 200 nm. These nanotubes are formed by the extension and retraction of actin-based filopodia that make physical contact with adjacent cells and connect them over long distances, allowing intercellular content exchange (Sisakhtnezhad and Khosravi 2015). Generally, this route for mitochondrial transfer is unidirectional, although there are cases in which it occurs in a bidirectional manner (He et al. 2011; Keller et al. 2017; Torralba et al. 2016). TNTs have an important role in mitochondrial transfer since their inhibition reduced the mitochondrial moving between cells (Bukoreshtliev et al. 2009). Rustom et al. (2004) demonstrated that other organelles, such as lysosomes, are also transferred between cells through these projections. Cells connected by TNTs can be the same or different types; for example, cardiomyocyte mitochondria could be transferred to endothelial progenitor cells (Koyanagi et al. 2005) and from neurons to astrocytes (Wang et al. 2012). In a model of lung damage induced by cigarette smoke, the movement of mitochondria from mesenchymal stem cells (MSCs) to epithelial cells of the airway (Li et al. 2014) via TNTs improved several parameters of mitochondrial activity: intracellular ATP, membrane potential, and oxygen consumption. Mitochondrial transfer via TNTs and their ability to improve cellular functionality have been described in several experimental models, including ischemic/reperfusion (Liu et al. 2014), renal tubular cells differentiation (Plotnikov et al. 2010), and cancer (Moschoi et al. 2016).

Extracellular vesicles are used for communication between cells in short- and long-distance ranges. Based on their size, exocytotic vesicles are classified as (1) exosomes (EVs), whose dimensions range from 30 to 100 nm, that originate in vesicular endosomes that fuse with the plasma membrane to be released into the extracellular space; and (2) microvesicles (MVs), which measure between 100 and 1000 nm and are released through outward budding of the plasma membrane (Holm et al. 2018). Evidence has shown that damaged cells may receive functional mitochondria from MVs (Miliotis et al. 2019; Morrison et al. 2017). In the central nervous system, astrocytes can donate functional mitochondria to neurons after ischemic stroke, allowing neuronal repair and neuroprotection (Hayakawa et al. 2016). In contrast, clusters of dysfunctional mitochondria in axonal protuberances are donated to astrocytes for their degradation (Davis et al. 2014). In human

fetal astrocytes, the release of “giant” MVs of 1–8 μm in diameter containing functional mitochondria was observed (Falchi et al. 2013). In addition, a new type of giant vesicle called exophers has been found in neurons from *Caenorhabditis elegans* (Melentijevic et al. 2017), and recently the release of damaged mitochondria into exophers from cardiomyocytes has been described as part of a cell-cleaning system (Nicolás-Ávila et al. 2020). Exophers, whose diameters range from approximately 4 μm , are formed around the neuronal soma and contain aggregated proteins, lysosomes, and damaged mitochondria, suggesting that exopher formation is an active mechanism for the elimination of damaged organelles (Melentijevic et al. 2017) (Figure 1).

All mentioned evidences highlight the mitochondrial transfer as a common naturally occurring phenomenon for the exchange of these organelles associated with cell repair and proliferation. However, the precise signaling pathway involved in mitochondrial transfer is still unknown.

Mitochondrial transplantation: what to expect?

For several years, some strategies aimed at mitochondria have been implemented to reverse the harmful effects

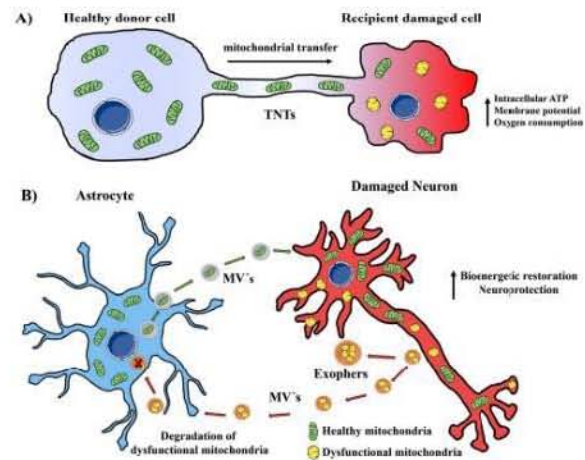


Figure 1: Mitochondrial transfer mechanisms.

(A) Tunneling nanotubes (TNTs) are extensions of the actin cytoskeleton that form communicating channels between cells and connect them over long distances, allowing intercellular content exchange.

(B) Extracellular vesicles are used for communication between cells. In the nervous system, astrocytes donate functional mitochondria to damaged neurons through microvesicles (MVs) and exophers.

of mitochondrial dysfunction. Supplementation with substrates for the electron transport chain (ETC) has been used as pharmacological therapy for mitochondrial improvement. Among these ECT substrates, pyruvate and beta-hydroxybutyrate are most commonly used to restore neuronal mitochondrial respiration and ATP levels after glucose deprivation (Laird et al. 2013). Mitochondrial complexes such as cytochrome C and coenzyme Q10 have been directly tested, showing some beneficial effects for cardiovascular and metabolic diseases (Pepe et al. 2007; Piel et al. 2007; Zozina et al. 2018). The administration of antioxidants has also been used to improve the mitochondrial antioxidant system, particularly in the brains of patients with PD (Jin et al. 2014). Additionally, as aforementioned, cytosolic proteins that are prone to aggregation can be imported into the mitochondria for degradation (Ruan et al. 2017), demonstrating that the improvement of mitochondrial proteostasis reduces the levels and toxicity of the A β peptide in an APPS_{we}/PSEN1_{dE9} mouse model and in *C. elegans* (Sorrentino et al. 2017). Thus, several groups have studied the positive effects of improving mitochondrial function pharmacologically or by the transfer of healthy mitochondria into damaged cells to decrease reactive oxygen species (ROS), restore ATP production, maintain Ca²⁺ homeostasis and proteostasis, repair mtDNA, and eventually allow damaged mitochondria to undergo mitophagy (Gollihue and Rabchevsky 2017; Shin et al. 2017).

There is growing evidence that mitochondrial transplantation is a feasible strategy to improve cellular functions in several models of human diseases, although the precise mechanisms involved in such potential benefits remain elusive. Initially, the uptake of isolated mitochondria into carcinoma cells for the transference of antibiotic resistance was reported (Clark and Shay 1982). Then, co-cubation of cells with xenogenic mitochondria transplanted from murine cells to human cells lacking mitochondria resulted in exogenous mitochondria incorporation and the reestablishment of aerobic energetics (Katrangi et al. 2007). Other *in vitro* transplant strategies have used cell-penetrating peptides such as Pep-1 (Morris et al. 2001), which is coupled to the mitochondria and produces pores in the cell membrane to facilitate mitochondrial entry. Exogenous mitochondria coupled to Pep-1 have been used in cellular models of PD to restore mitochondrial function and reduce the loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra (Chang et al. 2016). Additionally, a recent study showed that mitochondria-GFP coupled to Pep-1 can incorporate into cybrid cells that possess a mutation of the MELAS syndrome (mitochondrial encephalopathy with

lactic acidosis and stroke-like episodes), resulting in recovery of cellular respiration (Chang et al. 2017). Other strategy for delivering mitochondria to somatic cells using photothermal nanoblade that resulted in an efficient intracytoplasmic delivery of isolated functional mitochondria has also been reported (Wu et al. 2016).

The efficiency of mitochondrial transplantation has been demonstrated in *in vitro* transplants using GFP (green fluorescent protein)-labeled mitochondria that are efficiently taken up by PC-12 cells (pheochromocytoma cell line) (Gollihue et al. 2017). More recently, the antitumoral potential of mitochondrial transplantation, via passive uptake or Pep-1-mediated delivery, has revealed promising results on breast cancer cells (Chang et al. 2019), as well as significant effects in slowing tumor growth and increased animal survival in a mouse model of lung cancer metastasis (Fu et al. 2019).

The first observations of the benefits of mitochondrial transplantation *in vivo* were made in animal models of myocardial ischemia, where mitochondria incorporation demonstrated positive effects on heart function. Initially, it was found that in myocardial ischemia in rabbits, injection of mitochondria isolated from the heart muscle from healthy animals led to a substantial recovery in ATP production concomitant with a reduction in the size of the infarct area. Interestingly, in the same study, the authors demonstrated that the transplants of frozen dysfunctional mitochondria did not produce beneficial effects in restoring cardiac outcomes, demonstrating that mitochondria must be functional and competent for the positive effects of the transplant (McCully et al. 2009; Moskowitsova et al. 2019). Subsequently, autologous mitochondria transplants obtained from the pectoralis major muscle of rabbits were injected into the ischemic heart before reperfusion, producing an improvement in its mechanical parameters that was associated with the presence of the transplanted mitochondria in cardiomyocytes 2 h after transplantation (Masuzawa et al. 2013). The same approach of direct delivery of healthy mitochondria marked with iron oxide particles in a myocardial ischemic/reperfusion model in pigs was reported as well the incorporation of exogenous mitochondria and the improvement of cardiac function (Kaza et al. 2017). Mitochondrial transplantation was also tested in diabetic rat hearts resulting in enhanced myocardial postischemic function and decreased cellular injury (Doulamis et al. 2019).

In addition to the beneficial effects of directly injected mitochondria into the ischemic heart, systemic administration through the vasculature showed similar results. In

this sense, mitochondria isolated from human cardiac fibroblasts were injected through the coronary artery in rabbits subjected to an ischemia/reperfusion protocol. In this model, many exogenous mitochondria were found in the interstitial spaces and in cardiomyocytes (Cowan et al. 2016). Furthermore, *in vivo* experiments have shown that intracoronary delivery of healthy mitochondria significantly increased the coronary blood flow associated with ATP production and activation of vascular K_{IR} channels in swine heart (Shin et al. 2019).

Because the therapeutic approach of mitochondrial transplantation has shown promising results in animal models, some preliminary studies have been conducted in humans. The first clinical application of mitochondrial transplantation was performed in pediatric patients suffering from heart ischemia-reperfusion injury who were transplanted with autologous mitochondria isolated from the rectus abdominis muscle. After that, the patients had a significant improvement in their systolic function, allowing the withdrawal of extracorporeal membrane oxygenation support by the second day of mitochondrial transplant (Emani et al. 2017). Although the results of this work are encouraging, they have some limitations, such as the small number of patients evaluated and the lack of biochemical parameters of bioenergetic restoration. Therefore, this study should be considered as a first experimental protocol in the development of therapies that involve mitochondrial transplantation in humans. More recently, it has been reported that mitochondrial transplantation prolongs the time of freezing preservation for heart transplantation, suggesting that this procedure can also be used as a tool for improving organ transplantation outcomes (Moskowitzova et al. 2018).

Methodological strategies for mitochondrial transplantation

In general, mitochondrial transplantation is a simple strategy that consists of three major steps: isolation of active mitochondria, delivery of the mitochondria to the target organ, and, finally, uptake of the mitochondria by the target cells (Emani and McCully 2018; McCully et al. 2017) (Figure 2).

The mitochondria isolation procedure generally uses conventional protocols combined with new techniques to obtain a purified and viable mitochondrial fraction as quickly as possible. These improved techniques do not require differential centrifugation, which takes higher extraction times, and usually involve filtration and enzymatic digestion, substantially reducing the isolation time and ensuring a functional mitochondrial fraction (Preble et al. 2014). After isolation, the number of mitochondria to be transplanted must be determined. Recent studies have shown that a concentration of 1×10^7 mitochondria diluted in 0.1 mL of respiration buffer is sufficient for heart protection assays (McCully et al. 2017). Interestingly, it has been reported that isolated mitochondria co-incubated with cardiomyocytes are internalized in a time-dependent manner. Mitochondrial internalization is evident following 1 h of coincubation (5%), and this uptake rate increased by 20% after 4 h and 45% at 24 h of coincubation, which improved basal respiration and ATP production (Pacak et al. 2015). However, it is essential to standardize the mitochondrial concentrations according to the tissue of interest and the form of administration, as has been previously reviewed (Roushandeh et al. 2019).

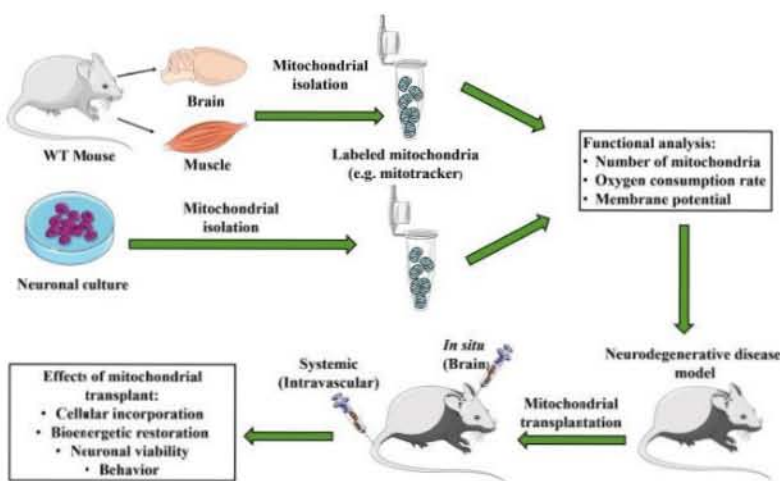


Figure 2: Mitochondrial transplant for the treatment of neurodegenerative diseases. Mitochondrial transplant is a simple therapeutic strategy that consists of three major steps: isolation of active mitochondria; delivery of mitochondria into the brain or through systemic administration; cellular uptake of exogenous mitochondria.

Two main methods have been developed for the administration of exogenous mitochondria: direct injection into the damaged organ or systemic administration of a bolus of mitochondria. Direct injection is an easy and efficient method because it allows a focal concentration of mitochondria into a specific group of cells. However, this method is invasive since other organs have to be manipulated to access the organ of interest, and multiple injections of mitochondria are often needed to achieve a global distribution within the affected organ (McCully et al. 2017). In contrast, systemic intravenous injection of a mitochondrial bolus permits a global distribution of functional mitochondria, which can facilitate mitochondrial delivery to any organ even when it is difficult to access, such as the brain (McCully et al. 2017; Shi et al. 2017). Systemically infused mitochondria are not incorporated into red blood cells because of the lack of endocytic capacity allowing mitochondrial circulation and uptake by cells of different organs (Shi et al. 2017). Interestingly, the presence of whole functional mitochondria in blood samples from humans or experimental animals has been described enclosed in vesicles, inside platelets, or even free allowing the interaction of extracellular mitochondria with other cells (Al Amir Dache et al. 2020; Miliotis et al. 2019; Song et al. 2020).

Mitochondrial transplantation in the nervous system

As previously mentioned, most of the research on mitochondrial transplantation has been performed in cellular and animal models and in patients with cardiac injury to reverse the damage induced by cardiac ischemia (Emani et al. 2017; Emani and McCully 2018). However, the possible use of this strategy for the treatment of diseases of the central nervous system has recently been tested in different experimental paradigms (Table 1). Initially, it was reported that in the rat optic nerve, neurons could concentrate dysfunctional mitochondria in axonal protruberances that are captured by adjacent astrocytes for their degradation (Davis et al. 2014). Additionally, astrocytes were shown to supply mitochondria to neurons subjected to glucose and oxygen deprivation to revert the bioenergetic damage *in vitro* and *in vivo* (Hayakawa et al. 2016) and release damaged mitochondrial into in the neurons of *C. elegans* (Melentijevic et al. 2017). Recently, it was reported that fragmented mitochondria released from microglia trigger the astrocytic response (Joshi et al. 2019), and a mechanism by which macrophages can transfer

mitochondria to sensory neurons to resolve inflammatory pain was shown (Raouf et al. 2020).

A study demonstrated that xenogenic mitochondria obtained from hamster cell lines injected locally through an intracerebral route or systemically through an intrarterial route restored the motor skills of rats with brain ischemia associated with the presence of new mitochondria in neurons and astrocytes (Huang et al. 2016). Another study has investigated the feasibility of allogenic mitochondria transplant into the medial forebrain bundle in a mouse model of PD induced with 6-hydroxydopamine (6-OHDA). In this case, the enhancement of mitochondrial function in neurons of the substantia nigra was demonstrated, and after three months, a substantial improvement in the motor performance of the treated animals was achieved (Chang et al. 2016). Consistent with the aforementioned study, other works have found similar results after systematic administration of mitochondria through the tail vein of mice treated with the neurotoxin MPTP to induce PD-like symptoms. The results of this study showed that mitochondrial transplantation improved motor activity, decreased ROS generation, and restored ATP levels and complex I activity (Shi et al. 2017). Interestingly, through this systemic administration, transplanted mitochondria were also identified in several tissues other than the brain, including the liver, heart, and kidneys.

Mitochondria transgenically labeled with GFP obtained from cellular cultures or from leg muscle were injected into the damaged spinal cord of rats. The transplanted mitochondria were found in microglial cells and in spinal cord motoneurons, producing a short-term neuroprotective effect (Gollihue et al. 2018, 2017). Other studies have shown that mitochondria transplanted into injured sciatic nerves affected the maintenance of cytoskeletal integrity and improved nerve-conducting properties and animal behavior (Kuo et al. 2017). In an *in vitro* model of oxygen–glucose deprivation, it was reported that conditioned media derived from endothelial progenitor cells contains functional mitochondria that are efficiently incorporated into brain endothelial cells, which leads to a decrease in the permeability of these brain cells and promotes angiogenesis. Interestingly, the protective effect of endothelial progenitor cell-derived mitochondria was associated with an increase in ATP, mtDNA, and TOM40 protein (Hayakawa et al. 2018). Additionally, host cells of injured cerebral microvasculature in an ischemic stroke model accepted the mitochondria that were transferred from the transplanted stem cells, resulting in increased angiogenesis, reduced infarct volume, and enhanced functional recovery (Liu et al. 2019). Additionally, the transplantation of autologous mitochondria isolated from pectoralis major muscle and infused into lateral

Table 1: Different models of neuronal damage in which mitochondrial transfer has shown potential benefits.

Model of study	Mitochondria source	Recipient cell	Main effects	Transfer route	Validation method	Reference
Optic nerve cells	Retinal ganglion cell	Astrocyte	Degradation of mitochondria by astrocytes	Physiological	SBEM, CM	(Davis et al. 2014)
Oxygen–glucose deprivation	Astrocyte	Neuron	Neuroprotection after stroke	Physiological and coculture	CM, EM, FC	(Hayakawa et al. 2016)
Rat model of Parkinson's disease	PC-12 cells	Neurons of the medial forebrain bundle	Improved complex I function and mitochondrial dynamics. Decreased neuronal loss	Coculture Direct injection in the MFB	CM	(Chang et al. 2016)
Ischemic rat brain	Fibroblasts (BHK-21)	Neurons, astrocytes, and microglia	Attenuated infarct area and neuronal cell death. Recovered motor skills	Intracerebral injection and femoral artery	CM, EM	(Huang et al. 2016)
SAH in rats and human CSF	Astrocytes	CSF	Improved clinical recovery	Physiological	EM, FC	(Chou et al. 2017)
Rat spinal cord damage	PC-12	PC-12 cells and microglia, macrophages, and endothelial cells	Incorporation of viable mitochondria into different cell types	Coculture	CM, EM	(Gollihue et al. 2017)
Axonal degeneration	Fibroblasts (BHK-21)	Sciatic nerve	Improved nerve conduction, muscle function, and animal behavior	Coculture Perineurium injection	CM	(Kuo et al. 2017)
<i>C. elegans</i>	Neurons	Exophers	Improved proteostasis and mitochondrial quality control	Physiological	CM, EM	(Melentijevic et al. 2017)
Mouse model of Parkinson's disease	HepG2 cells	Brain, liver, kidney, muscle, and heart	Increased activity of ETC, decreased ROS, and diminished cell death	Intravenous (tail vein)	CM	(Shi et al. 2017)
Rat model of spinal cord injury	PC-12 cells or soleus muscle	Multiple resident cell types in spinal cord	Improved mitochondrial bioenergetics	Direct injection in spinal cord	CM	(Gollihue et al. 2018)
EPCs	EPCs	Brain endothelial cells	Increased levels of TOM40, mitochondrial DNA copy number, and intracellular ATP	Physiological and coculture	CM, EM, FC, PCR	(Hayakawa et al. 2018)
Rat model of schizophrenia	Lymphoblasts	Cortical neurons	Improved cognitive performance and neuronal differentiation	Intra prefrontal cortex injection	CM, PCR	(Robicsek et al. 2018)
Alexander's disease	Astrocytes Neuron	Astrocytes	GFAP mutations impaired mitochondrial transfer	Physiological and coculture	CM, FC, PCR	(Gao et al. 2019)
Neuroinflammation	Microglia	Astrocyte	Induction of A1 astrocytic response	Physiological	CM, EM, PCR,	(Joshi et al. 2019)
Rat model of ischemic stroke	MSCs	Cerebral microvasculature	Improved mitochondrial activity, enhanced angiogenesis, and reduced infarct volume	Intra-arterial injection	CM	(Liu et al. 2019)
Glioma cells	Astrocytes	Glioma cells (U87)	Restored aerobic respiration and decreased the Warburg effect	Coculture Direct injected into the tumor	3DTM, CM, EM, FC, PCR	(Sun et al. 2019)

Table 1: (continued)

Model of study	Mitochondria source	Recipient cell	Main effects	Transfer route	Validation method	Reference
Rat cerebral ischemic injury	Muscle cells from pectoralis major	Neurons	Reduced oxidative stress and apoptosis, promoted neurogenesis, and attenuated astrogliosis	Intracerebroventricular injection	CM, EM	(Zhang et al. 2019)
Mouse model of inflammatory pain	Macrophages	Sensory neurons	Reduced inflammatory pain and improved oxidative phosphorylation.	Injected intrathecally	CM, FC	(Raouf et al. 2020)
Oxidant-damaged neurons	MSCs	Cortical neurons	Increased neuronal survival	Coculture	CM, FC	(Tseng et al. 2020)
Mouse model of traumatic brain injury	Brain	Brain	Reduced cell damage and long-term depression in the hippocampus	Direct injection into injury area	CM, EM, FC	(Zhang et al. 2020)
Aged mice	Liver from young mice	Brain, muscle, liver, kidney, heart, and lung tissue	Increased ATP, reduced ROS, and improved cognitive and motor performance	Intravenous (tail veins)	CM, EM, PCR	(Zhao et al. 2020)

ventricles reduced oxidative stress and apoptosis, attenuated reactive astrogliosis, and promoted neurogenesis after stroke in a model of middle cerebral artery occlusion in rats (Zhang et al. 2019). Similarly, treatment with exogenous mitochondria reduced cellular apoptosis, promoted angiogenesis, and alleviated brain edema and blood–brain barrier (BBB) leakage in mice subjected to traumatic brain injury (Zhang et al. 2020). Recently, intra-prefrontal injection of exogenous active mitochondria in a model of attentional deficits in young rats improved cognitive performance and prevented mitochondrial dysfunction (Robicsek et al. 2018). In another study, mitochondrial transfer from MSCs to mouse cortical neurons following hydrogen peroxide exposure increased neuronal survival and improved metabolism (Tseng et al. 2020), and also, intravenously injected mitochondria isolated from the livers of young mice into aged mice resulted in increased ATP, reduced ROS levels, and improved cognitive and motor performance in aged mice (Zhao et al. 2020).

Although it was reported that the exogenous mitochondria can cross the BBB (Wang et al. 2019; Zhao et al. 2020), the underlying mechanism is not yet clear but might involve the transcytosis pathway commonly used by macromolecules to cross BBB and gain access to the brain. Recently, the presence of free mitochondria in the cerebrospinal fluid (CSF) in animal models and patients with subarachnoid hemorrhage was reported. Although the role of this free mitochondria is unknown, the presence of CSF mitochondria with higher membrane potential is a positive

sign for better clinical outcomes after three months of brain hemorrhage onset in patients (Chou et al. 2017).

Transplanted mitochondria: how does it work?

To date, at least three mechanisms underlying mitochondrial uptake by cells have been described: actin-dependent endocytosis, caveolae-dependent endocytosis, and macropinocytosis. In some works, the endocytosis seems to be the dominant mechanism. Using a model of mitochondrial transfer from bone marrow–derived stromal cells to pulmonary alveoli cells, researchers found that the blockade of endocytosis and gap junction channels inhibits mitochondrial transfer (Islam et al. 2012). In another study, different mechanisms of internalization, such as actin polymerization, clathrin and caveolae-dependent endocytosis, and macropinocytosis, were blocked, demonstrating that the process for mitochondrial internalization is the actin-mediated endocytosis (Pacak et al. 2015). However, the participation of the macropinocytosis that requires the integrity of the mitochondrial outer membrane was also found (Kesner et al. 2016).

It has been observed that the mitochondrial Rho GTPase Miro 1 and the gap-junction protein connexin 43 can regulate intracellular mitochondrial movement from MSCs to epithelial cells (Ahmad et al. 2014; Tseng et al. 2020; Yao

et al. 2018). In neurons, mitochondria-containing vesicles released by astrocytes are internalized by a mechanism dependent on the CD38 membrane receptor, which is an ectoenzyme of the cyclic ADP-ribose pathway (Hayakawa et al. 2016). The role of CD38 in mitochondrial transfer has been supported by studies carried out in human glioma cells where endocytosis involving mitochondria internalization was mediated by NAD^+ -CD38-cADPR- Ca^{2+} signaling (Sun et al. 2019). Studies on the rare Alexander's disease showed that the presence of mutated GFAP reduced the expression of CD38 and impaired mitochondrial transfer between neurons and astrocytes (Gao et al. 2019).

An important factor that must be considered for mitochondrial transplantation is the possible immune response that could be triggered by foreign mitochondria. However, some evidence has indicated that autologous mitochondria isolated from muscle tissue do not activate the immune response after being transplanted (Masuzawa et al. 2013), and intraperitoneal administration of syngeneic and allogeneic mitochondria has shown that neither induces an alloreactive response (Ramirez-Barbieri et al. 2018).

Recently, a critical review has considered several factors that do not completely explain the protective effect of systemic *in vivo* administration of mitochondria to alleviate the damage of certain organs (Bertero et al. 2018). In particular, the mitochondrial viability after exposure to extracellular high Ca^{2+} concentrations during the transplant procedure has led to the discussion of how mitochondrial transplantation works *in vivo* (Bertero et al. 2020; McCully et al. 2020). Is it possible that the therapeutic effects of the transplanted mitochondria involve many other factors beyond bioenergetic restoration and ATP production? For example, exogenous mitochondria could donate mtDNA by a mechanism called "mitochondrial transformation" (Clark and Shay 1982) that may incorporate into the cell mitochondrial network to repair mtDNA mutations (Chang et al. 2017; Tachibana et al. 2009) or could participate in cellular repair through enzymes that preserve metabolic activity and promote cell survival. In this sense, it was found that the enzyme hexokinase I has a binding domain to interact with the outer mitochondrial membrane and might play a role in Akt-mediated cell survival signals as has been extensively reviewed (Robey and Hay 2006).

Conclusions

Mitochondrial dysfunction is amply documented as a central player in some neurodegenerative diseases. Mitochondrial damage could contribute early in the physiopathology

of brain diseases, producing bioenergetic deficits, signaling alterations, Ca^{2+} dysregulation and proteostasis, making neurons susceptible to additional damage leading to neurodegeneration. Therefore, manipulation of mitochondrial biology from a therapeutic perspective is attractive and has shown interesting results.

Recently, strategies have been developed to incorporate mitochondria into damaged tissue, and this approach has been translated to the clinic for treating cardiac ischemia. Experimentally, there are interesting results in animal models of brain ischemia, spinal cord injury, and PD. However, the efficiency of this therapeutic strategy and its use to counteract age-associated brain pathologies are still in early stages, and more studies are required to understand the incorporation and protective mechanisms, as well as the risk that mitochondria transplantation could represent.

Author contribution: All the authors have accepted responsibility for the entire content of this submitted manuscript and approved submission.

Research funding: This work was supported by Fundación Miguel Alemán, A.C., UNAM, DGAPA, PAPIIT grant number, IN20231.

Conflict of interest statement: The authors declare no conflicts of interest regarding this article.

References

- Adami, P.V.M., Quijano, C., Magnani, N., Galeano, P., Evelson, P., Cassina, A., Do Carmo, S., Leal, M.C., Castaño, E.M., Cuello, A.C., et al. (2017). Synaptosomal bioenergetic defects are associated with cognitive impairment in a transgenic rat model of early Alzheimer's disease. *J. Cerebr. Blood Flow Metabol.* 37: 69–84.
- Ahmad, T., Aggarwal, K., Pattnaik, B., Mukherjee, S., Sethi, T., Tiwari, B.K., Kumar, M., Micheal, A., Mabalirajan, U., Ghosh, B., et al. (2013). Computational classification of mitochondrial shapes reflects stress and redox state. *Cell Death Dis.* 4: e461–e461.
- Ahmad, T., Mukherjee, S., Pattnaik, B., Kumar, M., Singh, S., Kumar, M., Rehman, R., Tiwari, B.K., Jha, K.A., Barhanpurkar, A.P., et al. (2014). Miro1 regulates intercellular mitochondrial transport & amp: enhances mesenchymal stem cell rescue efficacy. *EMBO J.* 33. <https://doi.org/10.1002/embj.201386030>.
- Al Amir Dache, Z., Otandault, A., Tanos, R., Pastor, B., Meddeb, R., Sanchez, C., Arena, G., Lasorsa, L., Bennett, A., Grange, T., et al. (2020). Blood contains circulating cell-free respiratory competent mitochondria. *Faseb. J.* 34: 3616–3630.
- Alikhani, N., Ankaracrona, M., and Glaser, E. (2009). Mitochondria and Alzheimer's disease: amyloid- β peptide uptake and degradation by the presequence protease. *hPreP. J. Bioenerg. Biomembr.* 41: 447–451.

- Alikhani, N., Guo, L., Yan, S., Du, H., Pinho, C.M., Chen, J.X., Glaser, E., and Yan, S.S. (2011). Decreased proteolytic activity of the mitochondrial amyloid- β degrading enzyme, PreP peptidase, in Alzheimer's disease brain mitochondria. *J. Alzheim. Dis.* 27: 75–87.
- Baek, S.H., Park, S.J., Jeong, J.I., Kim, S.H., Han, J.J.-W.W., Kyung, J.W., Baik, S.-H.H., Choi, Y., Choi, B.Y., Park, J.S., et al. (2017). Inhibition of Drp1 ameliorates synaptic depression, A β deposition, and cognitive impairment in an Alzheimer's disease model. *J. Neurosci.* 37: 5099–5110.
- Berridge, M.V., McConnell, M.J., Grasso, C., Bajzikova, M., Kovarova, J., and Neuzil, J. (2016). Horizontal transfer of mitochondria between mammalian cells: beyond co-culture approaches, current opinion in genetics and development. *Elsevier Current Trends*. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2016.04.003>.
- Bertero, E., Maack, C., and O'Rourke, B. (2018). Mitochondrial transplantation in humans: "magical" cure or cause for concern? *J. Clin. Invest.* 128: 5191–5194.
- Bertero, E., O'Rourke, B., and Maack, C. (2020). Mitochondria do not survive calcium overload during transplantation. *Circ. Res.* <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.316291>.
- Bukoreshtliev, N.V., Wang, X., Hodneland, E., Gurke, S., Barroso, J.F.V., and Gerdes, H.H. (2009). Selective block of tunneling nanotube (TNT) formation inhibits intercellular organelle transfer between PC12 cells. *FEBS Lett.* 583: 1481–1488.
- Burté, F., Carelli, V., Chinnery, P.F., and Yu-Wai-Man, P. (2015). Disturbed mitochondrial dynamics and neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Neurol.* 11: 11–24.
- Chandel, N.S. (2014). Mitochondria as signaling organelles. *BMC Biol.* 12:34, <https://doi.org/10.1186/1741-7007-12-34>.
- Chang, J.C., Chang, H.S., Wu, Y.C., Cheng, W.L., Lin, T.T., Chang, H.J., Kuo, S.J., Chen, S.T., and Liu, C.S. (2019). Mitochondrial transplantation regulates antitumor activity chemoresistance and mitochondrial dynamics in breast cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res* 38. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1028-z>.
- Chang, J.C., Hoel, F., Liu, K.H., Wei, Y.H., Cheng, F.C., Kuo, S.J., Tronstad, K.J., and Liu, C.S. (2017). Peptide-mediated delivery of donor mitochondria improves mitochondrial function and cell viability in human cybrid cells with the MELAS A3243G mutation. *Sci. Rep.* 7: 10710.
- Chang, J.C., Wu, S.L., Liu, K.H., Chen, Y.H., Chuang, C.S., Cheng, F.C., Su, H.L., Wei, Y.H., Kuo, S.J., and Liu, C.S. (2016). Allogeneic/xenogeneic transplantation of peptide-labeled mitochondria in Parkinson's disease: restoration of mitochondria functions and attenuation of 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. *Transl. Res.* 170: 40–56e3.
- Chen, H., and Chan, D.C. (2009). Mitochondrial dynamics-fusion, fission, movement, and mitophagy-in neurodegenerative diseases. *Hum. Mol. Genet.* 18: R169–R176.
- Chen, H., McCaffery, J.M., and Chan, D.C. (2007). Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum. *Cell* 130: 548–562.
- Chou, S.H.Y.H.-Y., Lan, J., Esposito, E., Ning, M.M., Balaj, L., Ji, X., Lo, E.H., and Hayakawa, K. (2017). Extracellular mitochondria in cerebrospinal fluid and neurological recovery after subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 48: 2231–2237.
- Clark, M.A., and Shay, J.W. (1982). Mitochondrial transformation of mammalian cells. *Nature* 295: 605–607.
- Cowan, D.B., Yao, R., Akurathi, V., Snay, E.R., Thedsanamoorthy, J.K., Zurakowski, D., Ericsson, M., Friehs, I., Wu, Y., Levitsky, S., et al. (2016). Intracoronary delivery of mitochondria to the ischemic heart for cardioprotection. *PLoS One* 11: e0160889.
- Davis, C.O., Kim, K.-Y., Bushong, E.A., Mills, E.A., Boassa, D., Shih, T., Kinebuchi, M., Phan, S., Zhou, Y., Bihlmeyer, N.A., et al. (2014). Transcellular degradation of axonal mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111: 9633–9638.
- Devi, L., Raghavendran, V., Prabhu, B.M., Avadhani, N.G., and Anandatheerthavarada, H.K. (2008). Mitochondrial import and accumulation of α -synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. *J. Biol. Chem.* 283: 9089–9100.
- Divakaruni, S.S., Van Dyke, A.M., Chandra, R., LeGates, T.A., Contreras, M., Dharmasri, P.A., Higgs, H.N., Lobo, M.K., Thompson, S.M., and Blanpied, T.A. (2018). Long-term potentiation requires a rapid burst of dendritic mitochondrial fission during induction. *Neuron* 100: 860–875, e7.
- Doulamis, I.P., Guariento, A., Duignan, T., Orfany, A., Kido, T., Zurakowski, D., del Nido, P.J., and McCully, J.D. (2019). Mitochondrial transplantation for myocardial protection in diabetic hearts. *Eur. J. Cardio. Thorac. Surg.* 57: 836–845.
- Du, F., Yu, Q., Yan, S., Hu, G., Lue, L.F., Walker, D.G., Wu, L., Yan, S.F., Tieu, K., and Yan, S.S. (2017). PINK1 signalling rescues amyloid pathology and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Brain* 140: 3233–3251.
- Du, H., Guo, L., Yan, S., Sosunov, A.A., McKhann, G.M., and ShiDu Yan, S. (2010). Early deficits in synaptic mitochondria in an Alzheimer's disease mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107: 18670–18675.
- Dupont, M., Souriant, S., Lugo-Villarino, G., Maridonneau-Parini, I., and Vérolet, C. (2018). Tunneling nanotubes: intimate communication between myeloid cells. *Front. Immunol.* 9:43, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00043>.
- Emani, S.M., and McCully, J.D. (2018). *Mitochondrial transplantation: applications for pediatric patients with congenital heart disease*: AME Publishing Company, Translational Pediatrics, <https://doi.org/10.21037/tp.2018.02.02>.
- Emani, S.M., Piekarski, B.L., Harrild, D., del Nido, P.J., and McCully, J.D. (2017). Autologous mitochondrial transplantation for dysfunction after ischemia-reperfusion injury. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 154: 286–289.
- Erecinska, M., Cherian, S., and Silver, I.A. (2004). Energy metabolism in mammalian brain during development. *Prog. Neurobiol.* 73: 397–445.
- Falchi, A.M., Sogos, V., Saba, F., Piras, M., Congiu, T., and Piludu, M. (2013). Astrocytes shed large membrane vesicles that contain mitochondria, lipid droplets and ATP. *Histochem. Cell Biol.* 139: 221–231.
- Falkevall, A., Alikhani, N., Bhushan, S., Pavlov, P.F., Busch, K., Johnson, K.A., Eneqvist, T., Tjernberg, L., Ankarcrona, M., and Glaser, E. (2006). Degradation of the amyloid β -protein by the novel mitochondrial peptidase. *PreP. J. Biol. Chem.* 281: 29096–29104.
- Fang, E.F., Hou, Y., Palikaras, K., Adriaanse, B.A., Kerr, J.S., Yang, B., Lautrup, S., Hasan-Olive, M.M., Caponio, D., Dan, X., et al. (2019). Mitophagy inhibits amyloid- β and tau pathology and reverses

- cognitive deficits in models of Alzheimer's disease. *Nat. Neurosci.* 1. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0332-9>.
- Fu, A., Hou, Y., Yu, Z., Zhao, Z., and Liu, Z. (2019). Healthy mitochondria inhibit the metastatic melanoma in lungs. *Int. J. Biol. Sci.* 15: 2707–2718.
- Gao, L., Zhang, Z., Lu, J., and Pei, G. (2019). Mitochondria are dynamically transferring between human neural cells and alexander disease-associated GFAP mutations impair the astrocytic transfer. *Front. Cell. Neurosci.* 13: 316.
- Giorgi, C., Agnoletto, C., Bononi, A., Bonora, M., de Marchi, E., Marchi, S., Missiroli, S., Patergnani, S., Poletti, F., Rimessi, A., et al. (2012). Mitochondrial calcium homeostasis as potential target for mitochondrial medicine. *Mitochondrion* 12: 77–85.
- Gollihue, J.L., Patel, S.P., Eldahan, K.C., Cox, D.H., Donahue, R.R., Taylor, B.K., Sullivan, P.G., and Rabchevsky, A.G. (2018). Effects of mitochondrial transplantation on bioenergetics, cellular incorporation, and functional recovery after spinal cord injury. *J. Neurotrauma* 35: 1800–1818.
- Gollihue, J.L., Patel, S.P., Mashburn, C., Eldahan, K.C., Sullivan, P.G., and Rabchevsky, A.G. (2017). Optimization of mitochondrial isolation techniques for intraspinal transplantation procedures. *J. Neurosci. Methods* 287: 1–12.
- Gollihue, J.L., and Rabchevsky, A.G. (2017). Prospects for therapeutic mitochondrial transplantation. *Mitochondrion* 35: 70–79.
- Golpich, M., Amini, E., Mohamed, Z., Azman Ali, R., Mohamed Ibrahim, N., and Ahmadiani, A. (2017). Mitochondrial dysfunction and biogenesis in neurodegenerative diseases: pathogenesis and treatment. *CNS Neurosci. Ther.* 23: 5–22.
- Grossman, L.I., Wildman, D.E., Schmidt, T.R., and Goodman, M. (2004). Accelerated evolution of the electron transport chain in anthropoid primates. *Trends Genet.* 20: 578–585.
- Grünewald, A., Rygiel, K.A., Hepplewhite, P.D., Morris, C.M., Picard, M., and Turnbull, D.M. (2016). Mitochondrial DNA depletion in respiratory chain-deficient Parkinson disease neurons. *Ann. Neurol.* 79: 366–378.
- Gureev, A.P., Popov, V.N., and Starkov, A.A. (2020). Crosstalk between the mTOR and Nrf2/ARE signaling pathways as a target in the improvement of long-term potentiation. *Exp. Neurol.* <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113285>.
- Hara, Y., Yuk, F., Puri, R., Janssen, W.G.M., Rapp, P.R., and Morrison, J.H. (2014). Presynaptic mitochondrial morphology in monkey prefrontal cortex correlates with working memory and is improved with estrogen treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111: 486–491.
- Hayakawa, K., Chan, S.J., Mandeville, E.T., Park, J.H., Bruzzese, M., Montaner, J., Arai, K., Rosell, A., and Lo, E.H. (2018). Protective effects of endothelial progenitor cell-derived extracellular mitochondria in brain endothelium. *Stem Cells.* 36: 1404–1410.
- Hayakawa, K., Esposito, E., Wang, X., Terasaki, Y., Liu, Y., Xing, C., Ji, X., and Lo, E.H. (2016). Transfer of mitochondria from astrocytes to neurons after stroke. *Nature* 535: 551–555.
- He, K., Shi, X., Zhang, X., Dang, S., Ma, X., Liu, F., Xu, M., Lv, Z., Han, D., Fang, X., et al. (2011). Long-distance intercellular connectivity between cardiomyocytes and cardiofibroblasts mediated by membrane nanotubes. *Cardiovasc. Res.* 92: 39–47.
- Hirai, K., Aliev, G., Nunomura, A., Fujioka, H., Russell, R.L., Atwood, C.S., Johnson, A.B., Kress, Y., Vinters, H.V., Tabatou, M., et al. (2001). Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 21: 3017–3023.
- Holm, M.M., Kaiser, J., and Schwab, M.E. (2018). Extracellular vesicles: multimodal envoys in neural maintenance and repair. *Trends Neurosci.* 41: 360–372.
- Huang, P.J., Kuo, C.C., Lee, H.C., Shen, C.I., Cheng, F.C., Wu, S.F., Chang, J.C., Pan, H.C., Lin, S.Z., Liu, C.S., et al. (2016). Transferring xenogenic mitochondria provides neural protection against ischemic stress in ischemic rat brains. *Cell Transplant.* 25: 913–927.
- Islam, M.N., Das, S.R., Emin, M.T., Wei, M., Sun, L., Westphalen, K., Rowlands, D.J., Quadri, S.K., Bhattacharya, S., and Bhattacharya, J. (2012). Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury. *Nat. Med.* 18: 759–765.
- Jagmag, S.A., Tripathi, N., Shukla, S.D., Maiti, S., and Khurana, S. (2016). Evaluation of models of Parkinson's disease. *Front. Neurosci.* 9: 503.
- Jin, H., Kanthasamy, A., Ghosh, A., Anantharam, V., Kalyanaraman, B., and Kanthasamy, A.G. (2014). Mitochondria-targeted antioxidants for treatment of Parkinson's disease: preclinical and clinical outcomes. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Mol. Basis Dis.* 1842: 1282–1294.
- Joshi, A.U., Minhas, P.S., Liddelow, S.A., Haileselassie, B., Andreasson, K.I., Dorn, G.W., and Mochly-Rosen, D. (2019). Fragmented mitochondria released from microglia trigger A1 astrocytic response and propagate inflammatory neurodegeneration. *Nat. Neurosci.* 22: 1635–1648.
- Kandimalla, R., Manczak, M., Fry, D., Suneetha, Y., Sesaki, H., and Reddy, P.H. (2016). Reduced dynamin-related protein 1 protects against phosphorylated Tau-induced mitochondrial dysfunction and synaptic damage in Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.* 25: 4881–4897.
- Kang, J.S., Tian, J.H., Pan, P.Y., Zald, P., Li, C., Deng, C., and Sheng, Z.H. (2008). Docking of axonal mitochondria by syntaphilin controls their mobility and affects short-term facilitation. *Cell* 132: 137–148.
- Katragi, E., D'Souza, G., Boddapati, S.V., Kulawiec, M., Singh, K.K., Bigger, B., and Weissig, V. (2007). Xenogenic transfer of isolated murine mitochondria into human p0 cells can improve respiratory function. *Rejuvenation Res.* 10: 561–570.
- Kaza, A.K., Wamala, I., Friehs, I., Kuebler, J.D., Rathod, R.H., Berra, I., Ericsson, M., Yao, R., Thedsanamoorthy, J.K., Zurakowski, D., et al. (2017). Myocardial rescue with autologous mitochondrial transplantation in a porcine model of ischemia/reperfusion. *J Thoracic Cardiovasc Surg. Mosby*: 934–943. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2016.10.077>.
- Keller, K.E., Bradley, J.M., Sun, Y.Y., Yang, Y.F., and Acott, T.S. (2017). Tunneling nanotubes are novel cellular structures that communicate signals between trabecular meshwork cells. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 58: 5298–5307.
- Kesner, E.E., Saada-Reich, A., and Lorberboum-Galski, H. (2016). Characteristics of mitochondrial transformation into human cells. *Sci. Rep.* 6. <https://doi.org/10.1038/srep26057>.
- Khamsi, R. (2004). Energetic cells may have boosted the brain. *Nature.* <https://doi.org/10.1038/news041122-5>.
- Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y., and Shimizu, N. (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392: 605–608.
- Koyanagi, M., Brandes, R.P., Haendeler, J., Zeiher, A.M., and Dimmeler, S. (2005). Cell-to-cell connection of endothelial

- progenitor cells with cardiac myocytes by nanotubes: a novel mechanism for cell fate changes?. *Circ. Res.* 96: 1039–1041.
- Kuo, C.C., Su, H.L., Chang, T.L., Chiang, C.Y., Sheu, M.L., Cheng, F.C., Chen, C.J., Sheehan, J., and Pan, H.C. (2017). Prevention of axonal degeneration by perineurium injection of mitochondria in a sciatic nerve crush injury model. *Neurosurgery* 80: 475–488.
- Laird, M.D., Clerc, P., Polster, B.M., and Fiskum, G. (2013). Augmentation of normal and glutamate-impaired neuronal respiratory capacity by exogenous alternative biofuels. *Transl. Stroke Res.* 4: 643–651.
- Levy, M., Faas, G.C., Saggau, P., Craigen, W.J., and Sweatt, J.D. (2003). Mitochondrial regulation of synaptic plasticity in the hippocampus. *J. Biol. Chem.* 278: 17727–17734.
- Li, X., Zhang, Y., Yeung, S.C., Liang, Y., Liang, X., Ding, Y., Ip, M.S.M., Tse, H.-F., Mak, J.C.W., and Lian, Q. (2014). Mitochondrial transfer of induced pluripotent stem cell–derived mesenchymal stem cells to airway epithelial cells attenuates cigarette smoke–induced damage. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 51: 455–465.
- Li, Z., Okamoto, K.I., Hayashi, Y., and Sheng, M. (2004). The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. *Cell* 119: 873–887.
- Lin, M.-Y., and Sheng, Z.-H. (2015). Regulation of mitochondrial transport in neurons. *Exp. Cell Res.* 334: 35–44.
- Liu, K., Guo, L., Zhou, Z., Pan, M., and Yan, C. (2019). Mesenchymal stem cells transfer mitochondria into cerebral microvasculature and promote recovery from ischemic stroke. *Microvasc. Res.* 123: 74–80.
- Liu, K., Ji, K., Guo, L., Wu, W., Lu, H., Shan, P., and Yan, C. (2014). Mesenchymal stem cells rescue injured endothelial cells in an *in vitro* ischemia-reperfusion model via tunneling nanotube like structure-mediated mitochondrial transfer. *Microvasc. Res.* 92: 10–18.
- Manczak, M., Calkins, M.J., and Reddy, P.H. (2011). Impaired mitochondrial dynamics and abnormal interaction of amyloid beta with mitochondrial protein Drp1 in neurons from patients with Alzheimer's disease: implications for neuronal damage. *Hum. Mol. Genet.* 20: 2495–2509.
- Mandal, A., and Drerup, C.M. (2019). Axonal transport and mitochondrial function in neurons. *Front. Cell. Neurosci.* 13:373, <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00373>.
- Masuzawa, A., Black, K.M., Pacak, C.A., Ericsson, M., Barnett, R.J., Drumm, C., Seth, P., Bloch, D.B., Levitsky, S., Cowan, D.B., et al. (2013). Transplantation of autologously derived mitochondria protects the heart from ischemia-reperfusion injury. *AJP Hear. Circ. Physiol.* 304: H966–H982.
- McCully, J.D., Cowan, D.B., Emani, S.M., and del Nido, P.J. (2017). Mitochondrial transplantation: from animal models to clinical use in humans. *Mitochondrion* 34: 127–134.
- McCully, J.D., Cowan, D.B., Pacak, C.A., Toumpoulis, I.K., Dayalan, H., and Levitsky, S. (2009). Injection of isolated mitochondria during early reperfusion for cardioprotection. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 296: H94–H105.
- McCully, J.D., Emani, S.M., and Del Nido, P.J. (2020). Letter by McCully et al Regarding Article, “Mitochondria do not survive calcium overload. *Circ. Res.* <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.316832>.
- Melentijevic, I., Toth, M.L., Arnold, M.L., Guasp, R.J., Harinath, G., Nguyen, K.C., Taub, D., Parker, J.A., Neri, C., Gabel, C.V., et al. (2017). *C. elegans* neurons jettison protein aggregates and mitochondria under neurotoxic stress. *Nature* 542: 367–371.
- Miliotis, S., Nicolalde, B., Ortega, M., Yopez, J., and Caicedo, A. (2019). Forms of extracellular mitochondria and their impact in health. *Mitochondrion*.
- Morris, M.C., Depollier, J., Mery, J., Heitz, F., and Divita, G. (2001). A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* 19: 1173–1176.
- Morrison, T.J., Jackson, M.V., Cunningham, E.K., Kissenpfennig, A., McAuley, D.F., O’Kane, C.M., and Krasnodembskaya, A.D. (2017). Mesenchymal stromal cells modulate macrophages in clinically relevant lung injury models by extracellular vesicle mitochondrial transfer. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 196: 1275–1286.
- Moschoi, R., Imbert, V., Nebout, M., Chiche, J., Mary, D., Prebet, T., Saland, E., Castellano, R., Pouyet, L., Collette, Y., et al. (2016). Protective mitochondrial transfer from bone marrow stromal cells to acute myeloid leukemic cells during chemotherapy. *Blood* 128: 253–264.
- Moskowitzova, K., Liu, K., Shin, B., Ramirez-Barbieri, G.F., Guariento, A., Blitzer, D., Cowan, D.B., Thedsanamoorthy, J.K., Yao, R., Orfany, A., et al. (2018). Mitochondrial transplantation prolongs cold preservation time in murine cardiac transplantation. *J. Hear Lung Transplant.* 37: S22–S23.
- Moskowitzova, K., Shin, B., Liu, K., Ramirez-Barbieri, G., Guariento, A., Blitzer, D., Thedsanamoorthy, J.K., Yao, R., Snay, E.R., Inkster, J.A.H., et al. (2019). Mitochondrial transplantation prolongs cold ischemia time in murine heart transplantation 38, 92–99.
- Mossmann, D., Vögtle, F.N., Taskin, A.A., Teixeira, P.F., Ring, J., Burkhart, J.M., Burger, N., Pinho, C.M., Tadic, J., Loreth, D., et al. (2014). Amyloid- β peptide induces mitochondrial dysfunction by inhibition of preprotein maturation. *Cell Metabol.* 20: 662–669.
- Murray, L.M.A., and Krasnodembskaya, A.D. (2019). Concise review: intercellular communication via organelle transfer in the biology and therapeutic applications of stem cells. *Stem Cells.* 37: 14–25.
- Murthy, V.N., and Camilli, P. De. (2003). Cell biology of the presynaptic Terminal. *Annu. Rev. Neurosci.* 26: 701–728.
- Nakamura, K., Nemani, V.M., Azarbal, F., Skibinski, G., Levy, J.M., Egami, K., Munishkina, L., Zhang, J., Gardner, B., Wakabayashi, J., et al. (2011). Direct membrane association drives mitochondrial fission by the Parkinson disease-associated protein α -synuclein. *J. Biol. Chem.* 286: 20710–20726.
- Nakamura, K., Nemani, V.M., Wallender, E.K., Kaehlecke, K., Ott, M., and Edwards, R.H. (2008). Optical reporters for the conformation of α -synuclein reveal a specific interaction with mitochondria. *J. Neurosci.* 28: 12305–12317.
- Nguyen, P.V., Marin, L., and Atwood, H.L. (1997). Synaptic physiology and mitochondrial function in crayfish tonic and phasic motor neurons. *J. Neurophysiol.* 78: 281–294.
- Nicolás-Ávila, J.A., Lechuga-Vieco, A.V., Esteban-Martínez, L., Sánchez-Díaz, M., Díaz-García, E., Santiago, D.J., Rubio-Ponce, A., Li, J.L., Balachander, A., Quintana, J.A., et al. (2020). A network of macrophages supports mitochondrial homeostasis in the heart. *Cell*, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.031>.
- Pacak, C.A., Preble, J.M., Kondo, H., Seibel, P., Levitsky, S., del Nido, P.J., Cowan, D.B., and McCully, J.D. (2015). Actin-dependent mitochondrial internalization in cardiomyocytes: evidence for rescue of mitochondrial function. *Biol. Open* 4: 622–626.
- Park, J.-S.S., Davis, R.L., and Sue, C.M. (2018). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: new mechanistic insights and therapeutic perspectives. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 18: 21.

- Pepe, S., Marasco, S.F., Haas, S.J., Sheeran, F.L., Krum, H., and Rosenfeldt, F.L. (2007). Coenzyme Q10 in cardiovascular disease. *Mitochondrion* 7 Suppl: S154–S167.
- Perkins, G.A., Tjong, J., Brown, J.M., Poquiz, P.H., Scott, R.T., Kolson, D.R., Ellisman, M.H., and Spirou, G.A. (2010). The micro-architecture of mitochondria at active zones: electron tomography reveals novel anchoring scaffolds and cristae structured for high-rate metabolism. *J. Neurosci.* 30: 1015–1026.
- Picard, M., and McEwen, B.S. (2014). Mitochondria impact brain function and cognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111: 7–8.
- Pickrell, A.M., Huang, C.H., Kennedy, S.R., Ordureau, A., Sideris, D.P., Hoekstra, J.G., Harper, J.W., and Youle, R.J. (2015). Endogenous parkin preserves dopaminergic substantia nigral neurons following mitochondrial DNA mutagenic stress. *Neuron* 87: 371–381.
- Piel, D.A., Gruber, P.J., Weinheimer, C.J., Courtois, M.R., Robertson, C.M., Coopersmith, C.M., Deutschman, C.S., and Levy, R.J. (2007). Mitochondrial resuscitation with exogenous cytochrome c in the septic heart. *Crit. Care Med.* 35: 2120–2127.
- Plotnikov, E.Y., Khryapenkova, T.G., Galkina, S.I., Sukhikh, G.T., and Zorov, D.B. (2010). Cytoplasm and organelle transfer between mesenchymal multipotent stromal cells and renal tubular cells in co-culture. *Exp. Cell Res.* 316: 2447–2455.
- Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C.M., Halliday, G.M., Brundin, P., Volkman, J., Schrag, A.E., and Lang, A.E. (2017). Parkinson disease. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 3: 1–21.
- Pontzer, H., Brown, M.H., Raichlen, D.A., Dunsworth, H., Hare, B., Walker, K., Luke, A., Dugas, L.R., Durazo-Arvizu, R., Schoeller, D., et al. (2016). Metabolic acceleration and the evolution of human brain size and life history. *Nature* 533: 390–392.
- Preble, J.M., Pacak, C.A., Kondo, H., MacKay, A.A., Cowan, D.B., and McCully, J.D. (2014). Rapid isolation and purification of mitochondria for transplantation by tissue dissociation and differential filtration. *J. Vis. Exp.*: e51682. <https://doi.org/10.3791/51682>.
- Querfurth, H.W., and LaFerla, F.M. (2010). Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 362: 329–344.
- Ramirez-Barbieri, G., Moskowitova, K., Shin, B., Blitzer, D., Orfany, A., Guariento, A., Iken, K., Friehs, I., Zurakowski, D., del Nido, P.J., et al. (2018). Alloreactivity and allorecognition of syngeneic and allogeneic mitochondria. *Mitochondrion* 46: 103–115.
- Rangaraju, V., Calloway, N., and Ryan, T.A. (2014). Activity-driven local ATP synthesis is required for synaptic function. *Cell* 156: 825–835.
- Rangaraju, V., Lauterbach, M., and Schuman, E.M. (2019a). Spatially stable mitochondrial compartments fuel local translation during plasticity. *Cell* 176: 73–84.e15.
- Rangaraju, V., Lewis, T.L., Hirabayashi, Y., Bergami, M., Motori, E., Cartoni, R., Kwon, S.K., and Curchet, J. (2019b). Pleiotropic mitochondria: the influence of mitochondria on neuronal development and disease. *J. Neurosci.* 39: 8200–8208.
- Raouf, A.R., Vlist, M.V.D., Willemsen, H.L.D.M., and Prado, J. (2020). Macrophages transfer mitochondria to sensory neurons to resolve inflammatory pain. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.02.12.940445>.
- Rizzuto, R. (2001). Intracellular Ca²⁺ pools in neuronal signalling. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11: 306–311.
- Robey, R.B., and Hay, N. (2006). Mitochondrial hexokinases, novel mediators of the antiapoptotic effects of growth factors and Akt. *Oncogene* 25: 4683–4696.
- Robicsek, O., Ene, H.M., Karry, R., Ytzhaki, O., Asor, E., McPhie, D., Cohen, B.M., Ben-Yehuda, R., Weiner, I., and Ben-Shachar, D. (2018). Isolated mitochondria transfer improves neuronal differentiation of schizophrenia-derived induced pluripotent stem cells and rescues deficits in a rat model of the disorder. *Schizophr. Bull.* 44: 432–442.
- Roushandeh, A.M., Kuwahara, Y., and Roudkenar, M.H. (2019). Mitochondrial transplantation as a potential and novel master key for treatment of various incurable diseases. *Cytotechnology* 71: 647–663.
- Ruan, L., Zhou, C., Jin, E., Kucharavy, A., Zhang, Y., Wen, Z., Florens, L., and Li, R. (2017). Cytosolic proteostasis through importing of misfolded proteins into mitochondria. *Nature* 543: 443–446.
- Rustom, A., Saffrich, R., Markovic, I., Walther, P., and Gerdes, H.-H. (2004). Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science* 303: 1007–1010.
- Sarter, M., and Parikh, V. (2005). Choline transporters, cholinergic transmission and cognition. *Nat. Rev. Neurosci.* 6: 48–56.
- Saxton, W.M., and Hollenbeck, P.J. (2012). The axonal transport of mitochondria. *J. Cell Sci.* 125: 2095–2104.
- Scarffe, L.A., Stevens, D.A., Dawson, V.L., and Dawson, T.M. (2014). Parkin and PINK1: much more than mitophagy. *Trends Neurosci.* 37: 315–324.
- Schwarz, T.L. (2013). Mitochondrial trafficking in neurons. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011304>.
- Scott, I., and Youle, R.J. (2010). Mitochondrial fission and fusion. *Essays Biochem.* 47: 85–98.
- Sharpley, M.S., Marciniak, C., Eckel-Mahan, K., McManus, M., Crimi, M., Waymire, K., Lin, C.S., Masubuchi, S., Friend, N., Koike, M., et al. (2012). Heteroplasmy of mouse mtDNA is genetically unstable and results in altered behavior and cognition. *Cell* 151: 333–343.
- Shi, X., Zhao, M., Fu, C., and Fu, A. (2017). Intravenous administration of mitochondria for treating experimental Parkinson's disease. *Mitochondrion* 34: 91–100.
- Shin, B., Cowan, D.B., Emani, S.M., del Nido, P.J., and McCully, J.D. (2017). Mitochondrial transplantation in myocardial ischemia and reperfusion injury *Advances in experimental medicine and biology*. Cham: Springer, 595–619 https://doi.org/10.1007/978-3-319-55330-6_31.
- Shin, B., Saeed, M.Y., Esch, J.J., Guariento, A., Blitzer, D., Moskowitova, K., Ramirez-Barbieri, G., Orfany, A., Thedsanamoorthy, J.K., Cowan, D.B., et al. (2019). A novel biological strategy for myocardial protection by intracoronary delivery of mitochondria: safety and efficacy. *JACC Basic to Transl. Sci.* 4: 871–888.
- Silver, I., and Erecińska, M. (1998). Oxygen and ion concentrations in normoxic and hypoxic brain cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 454: 7–16.
- Sisakhtezhad, S., and Khosravi, L. (2015). Emerging physiological and pathological implications of tunneling nanotubes formation between cells. *Eur. J. Cell Biol.* 94: 429–443.
- Smith, G.M., and Gallo, G. (2018). The role of mitochondria in axon development and regeneration. *Dev. Neurobiol.* 78: 221–237.
- Song, X., Hu, W., Yu, H., Wang, H., Zhao, Y., Korngold, R., and Zhao, Yong. (2020). Existence of circulating mitochondria in human and animal peripheral blood. *Int. J. Mol. Sci.* 21: 2122.
- Sorrentino, V., Romani, M., Mouchiroud, L., Beck, J.S., Zhang, H., D'Amico, D., Moullan, N., Potenza, F., Schmid, A.W., Rietsch, S.,

- et al. (2017). Enhancing mitochondrial proteostasis reduces amyloid- β proteotoxicity. *Nature* 552: 187–193.
- Spees, J.L., Olson, S.D., Whitney, M.J., and Prockop, D.J. (2006). Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103: 1283–1288.
- Suen, D.F., Norris, K.L., and Youle, R.J. (2008). Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes Dev.* 22: 1577–1590.
- Sun, C., Liu, X., Wang, B., Wang, Z., Liu, Y., Di, C., Si, J., Li, H., Wu, Q., Xu, D., et al. (2019). Endocytosis-mediated mitochondrial transplantation: transferring normal human astrocytic mitochondria into glioma cells rescues aerobic respiration and enhances radiosensitivity. *Theranostics* 9: 3595–3607.
- Sun, T., Qiao, H., Pan, P.Y., Chen, Y., and Sheng, Z.H. (2013). Motile axonal mitochondria contribute to the variability of presynaptic strength. *Cell Rep.* 4: 413–419.
- Tachibana, M., Sparman, M., Sritanadomchai, H., Ma, H., Clepper, L., Woodward, J., Li, Y., Ramsey, C., Kolotushkina, O., and Mitalipov, S. (2009). Mitochondrial gene replacement in primate offspring and embryonic stem cells. *Nature* 461: 367–372.
- Tanaka, D., Nakada, K., Takao, K., Ogasawara, E., Kasahara, A., Sato, A., Yonekawa, H., Miyakawa, T., and Hayashi, J.I. (2008). Normal mitochondrial respiratory function is essential for spatial remote memory in mice. *Mol. Brain* 1: 21.
- Todorova, V., and Blokland, A. (2016). Mitochondria and synaptic plasticity in the mature and aging nervous system. *Curr. Neuropharmacol.* 15: 166–173.
- Torralba, D., Baixauli, F., and Sánchez-Madrid, F. (2016). Mitochondria know No boundaries: mechanisms and functions of intercellular mitochondrial transfer. *Front. Cell Dev. Biol.* 4: 107.
- Tseng, N., Lambie, S.C., Huynh, C.Q., Sanford, B., Patel, M., Herson, P.S., and Ormond, D.R. (2020). Mitochondrial transfer from mesenchymal stem cells improves neuronal metabolism after oxidant injury *in vitro*: the role of Miro1. *J. Cerebr. Blood Flow Metabol.* 271678X20928147, <https://doi.org/10.1177/0271678x20928147>.
- Verstreken, P., Ly, C.V., Venken, K.J.T., Koh, T.-W.W., Zhou, Y., and Bellen, H.J. (2005). Synaptic Mitochondria are critical for mobilization of reserve pool vesicles at *Drosophila* neuromuscular junctions. *Neuron* 47: 365–378.
- Wang, L., Guo, L., Lu, L., Sun, H., Shao, M., Beck, S.J., Li, L., Ramachandran, J., Du, Y., and Du, H. (2016). Synaptosomal mitochondrial dysfunction in 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One* 11: e0150441.
- Wang, X., Bukoreshtliev, N.V., and Gerdes, H.H. (2012). Developing neurons form transient nanotubes facilitating electrical coupling and calcium signaling with distant astrocytes. *PLoS One* 7 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047429>.
- Wang, X., Su, B., Lee, H.-g. H., Li, X., Perry, G., Smith, M., and Zhu, X. (2009). Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 29: 9090–9103.
- Wang, X., Su, B., Siedlak, S.L., Moreira, P.I., Fujioka, H., Wang, Y., Casadesus, G., and Zhu, X. (2008). Amyloid-beta overproduction causes abnormal mitochondrial dynamics via differential modulation of mitochondrial fission/fusion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105: 19318–19323.
- Wang, Y., Ni, J., Gao, C., Xie, L., Zhai, L., Cui, G., and Yin, X. (2019). Mitochondrial transplantation attenuates lipopolysaccharide-induced depression-like behaviors. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 93: 240–249.
- Wu, T.H., Sagullo, E., Case, D., Zheng, X., Li, Y., Hong, J.S., Teslaa, T., Patananan, A.N., McCaffery, J.M., Niazi, K., et al. (2016). Mitochondrial transfer by photothermal nanoblade restores metabolite profile in mammalian cells. *Cell Metabol.* 23: 921–929.
- Yao, J., Irwin, R.W., Zhao, L., Nilsen, J., Hamilton, R.T., and Brinton, R.D. (2009). Mitochondrial bioenergetic deficit precedes Alzheimer's pathology in female mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106: 14670–14675.
- Yao, Y., Fan, X.L., Jiang, D., Zhang, Y., Li, X., Xu, Z.B., Fang, S.B., Chiu, S., Tse, H.F., Lian, Q., et al. (2018). Connexin 43-mediated mitochondrial transfer of iPSC-MSCs alleviates asthma inflammation. *Stem Cell Rep* 11: 1120–1135.
- Youle, R.J., and van der Bliek, A.M. (2012). Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science* 337: 1062–1065.
- Zhang, B., Gao, Y., Li, Q., Sun, D., Dong, X., Li, X., Xin, W., and Zhang, J. (2020). Effects of brain-derived mitochondria on the function of neuron and vascular endothelial cell after traumatic brain injury. *World Neurosurg* 138. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2019.11.172>.
- Zhang, L., Trushin, S., Christensen, T.A., Bachmeier, B.V., Gateno, B., Schroeder, A., Yao, J., Itoh, K., Sesaki, H., Poon, W.W., et al. (2016). Altered brain energetics induces mitochondrial fission arrest in Alzheimer's Disease. *Sci. Rep.* 6: 18725.
- Zhang, Z., Ma, Z., Yan, C., Pu, K., Wu, M., Bai, J., Li, Y., and Wang, Q. (2019). Muscle-derived autologous mitochondrial transplantation: a novel strategy for treating cerebral ischemic injury. *Behav. Brain Res.* 356: 322–331.
- Zhao, Y., Jiang, Z., Delgado, E., Li, H., Zhou, H., Hu, W., Perez-Basterrechea, M., Janostakova, A., Tan, Q., Wang, J., et al. (2017). Platelet-derived mitochondria display embryonic stem cell markers and improve pancreatic islet b-cell function in humans. *Stem Cells Transl. Med.* 6: 1684–1697.
- Zhao, Z., Yu, Z., Hou, Y., Zhang, L., and Fu, A. (2020). Improvement of cognitive and motor performance with mitotherapy in aged mice. *Int. J. Biol. Sci.* 16: 849–858.
- Zheng, Y.R., Zhang, X.N., and Chen, Z. (2019). Mitochondrial transport serves as a mitochondrial quality control strategy in axons: implications for central nervous system disorders. *CNS Neurosci. Ther.* 25: 876–886.
- Zorov, D.B., Juhaszova, M., and Sollott, S.J. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol. Rev.* 94: 909–950.
- Zozina, V.I., Covantev, S., Goroshko, O.A., Krasnykh, L.M., and Kukes, V.G. (2018). Coenzyme Q10 in cardiovascular and metabolic diseases: current state of the problem. *Curr. Cardiol. Rev.* 14: 164–174.