

Sara Oliván García

Alteración de la autofagia y su modulación por una dieta rica en lípidos en un modelo murino de Esclerosis Lateral Amiotrófica

Departamento
Anatomía, Embriología y Genética Animal

Director/es
Osta Pinzolas, Rosario
Calvo Royo, Ana Cristina

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

ALTERACIÓN DE LA AUTOFAGIA Y SU
MODULACIÓN POR UNA DIETA RICA EN LÍPIDOS
EN UN MODELO MURINO DE ESCLEROSIS
LATERAL AMIOTRÓFICA

Autor

Sara Oliván García

Director/es

Osta Pinzolas, Rosario
Calvo Royo, Ana Cristina

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Anatomía, Embriología y Genética Animal

2014



Universidad
Zaragoza

**ALTERACIÓN DE LA AUTOFAGIA Y SU
MODULACIÓN POR UNA DIETA RICA EN
LÍPIDOS EN UN MODELO MURINO DE
ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA**

TESIS DOCTORAL
SARA OLIVÁN GARCÍA
2014



Universidad
Zaragoza

LABORATORIO DE GENETICA BIOQUIMICA (LAGENBIO)

Dpto. Anatomía, Embriología y Genética Animal
Facultad de Veterinaria
Universidad de Zaragoza

**Alteración de la autofagia y su modulación
por una dieta rica en lípidos en un modelo
murino de Esclerosis Lateral Amiotrófica**

Memoria presentada por

Sara Oliván García

Para optar al grado de Doctora por la Universidad de Zaragoza
Zaragoza, Junio 2014



LAGENBIO
Laboratorio de
Genética Bioquímica
Universidad Zaragoza

Doña **Rosario Osta Pinzolas**, Profesora Titular, y Doña **Ana Cristina Calvo Royo**, Profesora Asociada, del Departamento De Anatomía, Embriología y Genética Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza.

CERTIFICAN QUE:

La Tesis Doctoral titulada "*Alteración de la autofagia y su modulación por una dieta rica en lípidos en un modelo murino de Esclerosis Lateral Amiotrófica*" que se recoge en la presente Memoria, de la que es autora **Sara Oliván García**, ha sido realizada bajo nuestra dirección y se corresponde con el Proyecto de Tesis aprobado por la Comisión de Doctorado en Abril de 2013, cumpliendo, por tanto, todos los requisitos exigidos para que su autora pueda optar al Grado de Doctora por la Universidad de Zaragoza con la mención de "Doctor Europeo".

Y para que así conste, firman la presente en Zaragoza a 12 de Mayo de 2014.

Fdo. Rosario Osta Pinzolas

Fdo. Ana Cristina Cavo Royo

Este trabajo ha sido financiado por los siguientes organismos y proyectos:

- *“Células madre como biomarcador y/o diana terapéutica en la Esclerosis Lateral Amiotrófica”*. Financiado con el proyecto del Instituto de Salud Carlos III. Fondo de Investigación Sanitaria. PI10/01781. 2011-2014.
- *“Stop-ELA, una aproximación multi-tecnológica para el desarrollo de nuevas terapias y sistemas avanzados de administración farmacológica en Esclerosis Lateral Amiotrófica”*. Financiado con el programa INNPACTO del Ministerio de Ciencia e Innovación. IPT-2011-1091-900000. Año 2011.
- *“Defining targets for therapeutics in Spinal Muscular Atrophy”*. Financiado por el proyecto Gename de Genoma S.A. 2007-2010.
- *“Genética contra las enfermedades del sistema nervioso”*. *“Curar con genes enfermedades del Sistema Nervioso Central”*. Financiado por el programa “Tú eliges, tú decides” de Caja Navarra. Año 2008 y 2012.
- *Beca para estancia en centros nacionales y extranjeros de reconocido prestigio en el campo de la Medicina Regenerativa*. Financiado por el Programa Aragonés de Medicina Regenerativa (PAMER) del Instituto Aragonés de la Salud (IC+S). 2009.

A Mario e Iñaki

Si ha sido duro enfrentarse a un folio en blanco a la hora de escribir esta tesis, hacerlo para dar las gracias todavía lo es más, sobre todo cuando hay tanto que agradecer que no sabes ni cómo hacerlo ni por dónde empezar. Han sido muchas las personas con las que he compartido momentos de este trabajo, y he aprendido tanto de ellas, que solo puedo decir "GRACIAS, MUCHISIMAS GRACIAS A TODOS".

Gracias a Charo y AnaC, mis directoras y compañeras en este largo proceso. Gracias Charo por permitirme estar aquí, por confiar en mí y darme la oportunidad de realizar este trabajo. Tu compromiso con el trabajo y con tu gente es envidiable. AnaC, gracias por estar siempre ahí, dispuesta a cualquier cosa, y siempre con una sonrisa.

Gracias a Don Isaías Zarazaga y Pilar Zaragoza, probablemente sin ellos este grupo no sería lo que es.

Gracias a Clemen, a Inma y a Janne (kiitos) por su ayuda y sus consejos.

Gracias a Carmen, a Arianne y a Ana Solana por esas conversaciones de poyata tan amenas. Qué sería del trabajo sin esos momentos...

Gracias a mis compañeros de laboratorio, los "Lagenbieros" (Amaya, Ana Rosa, Bea, Diego, Edu, Miriam, Raquel, Samanta y Samuel), a Laura B y a los chicos del master (David, Laura y Marcos) por las historietas, las risas, el apoyo, el ánimo, la ayuda y sobre todo por el cariño que me habéis transmitido a pesar de ser la viejuna del grupo.

Gracias a las personas que han pasado por el departamento, pero que en este momento ya no están, por los momentos compartidos. María, Marta, Karen, Carmina, Laura, Fernando, Jaber y Paola.

Gracias a Bioterio. Rosa, Eduardo, Josemi y Chus, y sobre todo a mis chicas favoritas, Pilar y Silvia o Silvia y Pilar, por cuidar de mis golosinas. Esto no hubiera sido ni tan fácil ni tan bonito.

Gracias a toda la gente con la que he ido trabajando/colaborando a lo largo de estos años. El grupo de Josep Esquerda de la Universidad de Lérida, a José Aguilera y Xavi Navarro de la Universidad Autónoma de Barcelona y al Proyecto Gename. Porque la diversidad siempre es enriquecedora.

Gracias a Rafael Yáñez y a su gente (Gabi, Celine, Ngoc, Hui, Tizzi, Klaus, Martin, Sheriff, Hayder y Hanna) de la Royal Holloway University of London por darme la oportunidad de conocer la otra cara de UK. De las mejores experiencias de mi vida a todos los niveles.

Gracias a Patricia Boya por abrirme la puerta a este mundo de la autofagia.

Gracias a la gente del grupo GEMM de la Escuela de Ingeniería por acogerme siempre con una sonrisa.

Gracias al departamento de Farmacología y en particular a Maria Jesús Muñoz y Ana Rosa Abadía por enseñarme a enseñar.

Gracias al grupo de Toxicología de la Facultad de Veterinaria por prestarme el criostato y abrirme las puertas de su laboratorio tan amablemente (literalmente).

Gracias al grupo del Doctor Jesús Osada por la suerte que he tenido y lo fácil que ha sido colaborar con vosotros.

Gracias a tito Berto que ha entrado a formar parte de “nuestra pequeña familia” por todo.

Gracias a mi cuadrilla de Calahorra por esas interminables cenas que acaban con todos los problemas del mundo.

Gracias a mis padres, a mi hermano y a Eva, a mis sobris favoritos María, Juan y Carolina, y a la tía Pepi; por estar siempre ahí para cualquier cosa y por ser lo que son y como son.

Gracias a Iñaki y a Mario, “mi pequeña familia”, por enseñarme que todo en esta vida es posible, que lo complicado en realidad es sencillo y que los problemas son relativos. Gracias Mario por aportarme esta paz. Con vosotros nunca llueve eternamente...

INDICE

| | |
|---|----------|
| 1 RESUMEN/SUMMARY | 1 |
| 2 INTRODUCCIÓN | 5 |
| 2.1 <i>ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA</i> | 7 |
| 2.1.1 ASPECTOS GENERALES DE LA ENFERMEDAD | 7 |
| 2.1.2 CLASIFICACIÓN | 8 |
| 2.1.3.1 Excitotoxicidad | 11 |
| 2.1.3.2 Alteración del transporte axonal | 12 |
| 2.1.3.3 Disfunción mitocondrial | 14 |
| 2.1.3.4 Estrés oxidativo | 15 |
| 2.1.3.5 Agregación proteica | 17 |
| 2.1.3.6 Neuroinflamación | 19 |
| 2.1.3.7 Procesamiento de RNA | 20 |
| 2.1.3.8 Tráfico endosomal | 22 |
| 2.1.3.9 Epigenética por metilación del DNA | 23 |
| 2.1.4 IMPLICACIÓN DEL MUSCULO EN LA ELA | 23 |
| 2.2 <i>PROTEASOMA</i> | 25 |
| 2.2.1 ESTRUCTURA Y MECANISMO DE ACCIÓN DEL PROTEASOMA 26S | 26 |
| 2.2.2 PROCESO UBIQUITINACIÓN | 28 |
| 2.2.3 PROTEASOMA Y PATOGENESIS DE LA ELA | 30 |
| 2.3 <i>AUTOFAGIA</i> | 34 |
| 2.3.1 ASPECTOS GENERALES | 34 |
| 2.3.2 CLASIFICACIÓN | 35 |
| 2.3.2.1 Macroautofagia | 36 |
| 2.3.2.2 Microautofagia | 38 |
| 2.3.2.3 Autofagia mediada por chaperonas (CMA) | 38 |
| 2.3.2 REGULACION DE LA AUTOFAGIA | 38 |
| 2.3.3 AUTOFAGIA Y ELA | 41 |
| 2.3.3.1 Motoneuronas SOD1G93A y autofagia | 42 |
| 2.3.3.2 Músculo y autofagia | 44 |
| 2.4 <i>APOPTOSIS</i> | 45 |
| 2.4.1 ASPECTOS GENERALES DE LA APOPTOSIS | 45 |
| 2.4.1.1 Apoptosis extrínseca | 45 |
| 2.4.1.2 Apoptosis intrínseca | 47 |
| 2.4.2 APOPTOSIS EN LA ELA | 47 |

| | |
|--|-----------|
| 2.5 RELACION ENTRE PROTEASOMA, AUTOFAGIA Y APOPTOSIS..... | 50 |
| 2.5.1 AUTOFAGIA Y PROTEASOMA | 50 |
| 2.5.1.1 Tipo de proteína a degradar | 51 |
| 2.5.1.2 Señalización de las proteínas | 51 |
| 2.5.1.3 Moléculas comunes adaptadoras | 52 |
| 2.5.1.4 Moléculas comunes reguladoras | 52 |
| 2.5.1.5 Mecanismos integrativos | 53 |
| 2.5.1.5.1 Vía del estrés del ER | 53 |
| 2.5.1.5.2 Factor de transcripción FoxO | 54 |
| 2.5.1.5.3 Niveles de energía celular disponible | 54 |
| 2.5.2 AUTOFAGIA Y APOPTOSIS | 54 |
| 2.6 METABOLISMO DE LÍPIDOS EN ELA | 60 |
| 2.5.1 METABOLISMO DE LÍPIDOS Y AUTOFAGIA | 60 |
| 2.5.2 METABOLISMO ENERGÉTICO | 61 |
| 2.5.3 TRATAMIENTO DE LA ELA CON LÍPIDOS | 65 |
| 3 OBJETIVOS..... | 67 |
| 4 MATERIAL Y MÉTODOS | 71 |
| 4.1 MODELO ANIMAL..... | 73 |
| 4.1.1 ASPECTOS GENERALES DEL MODELO MURINO SOD1G93A DE ELA | 73 |
| 4.1.2 GENOTIPADO | 74 |
| 4.1.3 EXTRACCION Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS ANIMALES | 75 |
| 4.2 PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL | 76 |
| 4.2.1 EXTRACCIÓN DEL RNA TOTAL | 76 |
| 4.2.2 SINTESIS DE DNA COMPLEMENTARIO O cDNA | 76 |
| 4.2.3 PCR EN TIEMPO REAL (RT-PCR) | 76 |
| 4.3 WESTERN BLOT..... | 78 |
| 4.3.1 EXTRACCION Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEINA | 78 |
| 4.3.2 ELECTROFORESIS E INMUNODETECCIÓN | 78 |
| 4.4 DETECCIÓN DE APOPTOSIS: TUNEL..... | 80 |
| 4.5 ENSAYO IN VITRO DE LA CLOROQUINA..... | 80 |
| 4.6 ACTIVIDAD PROTEASOMA..... | 81 |
| 4.6.1 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN PROTEÍNA | 81 |
| 4.6.2 MEDIDA ACTIVIDAD PROTEASOMA 26S | 82 |

| | |
|--|------------|
| 4.7 PRUEBAS DE COMPORTAMIENTO EN EL MODELO ANIMAL..... | 82 |
| 4.7.1 PESO | 82 |
| 4.7.2 TEST DEL ROTAROD | 83 |
| 4.7.3 TEST DE LA REJILLA | 83 |
| 4.7.4 TREADMILL | 83 |
| 4.7.5 SUPERVIVENCIA | 84 |
| 4.8 HERRAMIENTAS BIOINFORMATICAS Y ESTADÍSTICA | 84 |
| 4.8.1 HERRAMIENTAS BIOINFORMATICAS | 84 |
| 4.8.2 HERRAMIENTAS ESTADÍSTICAS | 84 |
| 5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 87 |
| 5.1 MANUSCRITO 1..... | 93 |
| 5.2 MANUSCRITO 2..... | 98 |
| 5.3 MANUSCRITO 3..... | 118 |
| 5.4 MANUSCRITO 4..... | 133 |
| 5.5 MANUSCRITO 5..... | 157 |
| 6 CONCLUSIONES | 177 |
| 7 BIBLIOGRAFÍA | 181 |
| 8 ABREVIATURAS..... | 199 |

RESUMEN/SUMMARY



La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa que se caracteriza por una afectación y pérdida selectiva de las motoneuronas y por una progresiva debilidad muscular. Los mecanismos fisiopatológicos causantes de esta enfermedad no se conocen todavía, pero en los últimos años, entre las muchas teorías propuestas, se postula que la acumulación de proteínas anormalmente plegadas podría estar relacionada con el desarrollo de la enfermedad. Los dos principales mecanismos que participan en la proteostasis celular son la autofagia y el sistema ubiquitina-proteasoma (UPS), y ambos procesos pueden ser esenciales para la reducción de la toxicidad mediada por la proteína SOD1 mutada.

En esta Tesis Doctoral se han estudiado los procesos de degradación proteica mediada por la autofagia y por el proteasoma, así como los procesos de muerte celular programada a lo largo de la enfermedad en el músculo esquelético y la médula espinal en el modelo murino SOD1G93A.

En un primer lugar, para eliminar el sesgo por el efecto del género en los procedimientos experimentales, se determinaron las diferencias existentes entre machos y hembras en la autofagia constitutiva en el músculo esquelético y la médula espinal de ratones wild type. Los resultados obtenidos indican que existen diferencias en los marcadores de autofagia objeto de estudio (LC3 y p62) entre ambos sexos, y además estas diferencias son específicas del tejido estudiado.

Después de confirmar la necesidad de incluir grupos experimentales balanceados para el sexo, se ha estudiado la activación de la autofagia y el proteasoma en el músculo esquelético de los ratones modelo a lo largo de la enfermedad. Los datos obtenidos indican una alteración en la actividad del proteasoma en los estadios estudiados y un aumento de la autofagia en el estadio terminal de la enfermedad. Además el análisis del proceso de muerte celular por apoptosis, indica que no se producen una activación significativa de la misma a lo largo de la progresión de la enfermedad.

Por otra parte, se han analizado distintas pruebas de comportamiento para conocer cuál de ellas es la más adecuada para poder evaluar el efecto de un posible tratamiento en nuestros ratones modelo. Los resultados obtenidos muestran que tanto la prueba de rotarod como de la rejilla, son las pruebas más sensibles para detectar fallos tempranos en el comportamiento motor de los

ratones, y además estas pruebas permiten una adecuada caracterización del comportamiento motor de dichos animales.

Posteriormente, se realizó un ensayo pre-clínico consistente en la administración de una dieta enriquecida en lípidos, concretamente con aceite de oliva extra virgen y de palma, en los ratones modelo. La ingestión de la dieta enriquecida con aceite de oliva mejora el comportamiento motor y aumenta la supervivencia de los animales, además de mejorar el estado del músculo como lo evidencia el aumento del grosor de las fibras. Tal y como esperábamos, esta dieta produce una mejora de los indicadores moleculares de la autofagia y de los parámetros asociados al estrés del retículo endoplasmático y al daño muscular en el estadio terminal de la enfermedad.

Finalmente, puesto que los procesos de muerte celular programada han sido ampliamente estudiados en la médula espinal, pero no los procesos de degradación proteica, se ha llevado a cabo el estudio de los mismos en dicho tejido. El análisis de estos mecanismos a lo largo de la enfermedad en el modelo animal indica que la autofagia no tiene un papel tan relevante como en el músculo esquelético, y el proteasoma se encuentra activado sólo en estadios terminales de la enfermedad.

Las alteraciones observadas en los procesos de degradación proteica objeto de estudio a lo largo de la enfermedad se presentan como una posible diana terapéutica, tal como se ha demostrado con la administración de una dieta enriquecida con aceite de oliva extra virgen.

.

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease characterized by a selective motor neuron loss and a progressive muscle weakness. The cause of the physiopathological mechanisms remains unknown although recently, it is believed that the misfolded protein accumulation could be in close relation to the progression of the disease. The two main mechanisms involved in the cellular proteostasis are autophagy and the ubiquitin-proteasome system (UPS). Indeed, these processes can play an essential role in the amelioration of the mutant SOD1 mediated toxicity.

In this Doctoral Thesis the protein degradative systems by means of autophagy and the proteasome have been analyzed together with the programme cell death mechanisms, along disease progression, in the skeletal muscle and the spinal cord from a murine model SOD1G93A.

Firstly, to eliminate sex bias in the experimental procedures, the differences between male and female mice in constitutive autophagy was determined. For this purpose, skeletal muscle and spinal cord tissues from wild type mice were studied. The results showed sex-dependent differences in each tissue when autophagy markers were analyzed (LC3 and p62).

The next step and taking into consideration the need for using sex balanced groups of animals, the activation of autophagy and the proteasome in the skeletal muscle from the murine model along disease progression was assessed. The data showed an alteration in the proteasome activity and an autophagy activation at the terminal stage of the disease. Furthermore, no significant activation of the apoptotic cellular death was observed along disease progression.

On the other hand, different behavioral tests have been analyzed to determine which of them is the most appropriate to evaluate the effect of a possible treatment in the animal model. The results suggested that either rotarod or hanging wire tests were the most sensitive tests to detect early symptoms in the motor behavior in the mice. In addition, these tests allowed an adequate characterization of the motor behavior in these animals.

Afterwards, a preclinical trial focused on the administration of a lipid enriched-diet was carried out. In particular, the transgenic mice were fed with extra virgin olive oil and palm oil. The olive oil enriched-diet improved the motor behavior and increased the survival of the animals. In addition, this enriched diet improved

the muscle state as evidenced by an increment in the thickness of the muscle fibres. As we expected, this enriched diet induced an improvement in the molecular markers of autophagy, endoplasmic reticulum stress and muscle damage at the terminal stage of the disease.

Finally, due to the study in depth of the cellular programme death mechanisms in the spinal cord tissue, we analyzed the less known protein degradative processes in this tissue. The analysis of these mechanisms along disease progression in the animal model suggested that autophagy did not play a relevant role as it was observed in skeletal muscle. Furthermore, the proteasome was only activated at terminal stages of the disease.

The impairments found in the protein degradative processes, which have been studied along disease progression, become a potential therapeutic target as it has been shown under an extra virgin olive oil enriched-diet treatment.

INTRODUCCIÓN



2.1 ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA

2.1.1 ASPECTOS GENERALES DE LA ENFERMEDAD

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa que generalmente se manifiesta en la edad adulta, y se caracteriza por una afectación selectiva de las motoneuronas del cerebro y de la médula, y por una progresiva debilidad muscular. Concretamente, causa la lesión y muerte de las motoneuronas inferiores del tronco cerebral y de la médula espinal, así como la de las motoneuronas superiores de la corteza motora. La pérdida de estas neuronas provoca en el músculo atrofia, debilidad, fasciculaciones y espasticidad, llegando a causar la parálisis del enfermo y finalmente, la muerte por fallo respiratorio. Si bien es cierto que en un principio la ELA fue considerada como un trastorno motor puro, hallazgos recientes han puesto de manifiesto la implicación de vías sensoriales y espinocerebelosas, así como la de neuronas de la sustancia negra y células granulosas del giro dentado del hipocampo (Ferraiuolo et al. 2011). Además, en los últimos años, se ha propuesto que en la degeneración de las motoneuronas podrían estar implicadas tanto las células de la glía como las del músculo. De este modo, se está pasando de la creencia inicial de que la muerte de la motoneurona era causada exclusivamente por un daño directo a éstas, a la aceptación de que la ELA es un trastorno multisistémico en el que están implicados distintos tipos celulares como el músculo, la glía o las neuronas. Aunque las motoneuronas muestran signos prematuros de afectación de un modo más severo, se producen también alteraciones en parámetros fisiológicos, estructurales y metabólicos en las células de la glía y en el músculo; por lo que se puede considerar que tejidos no neuronales como el músculo esquelético pueden actuar como dianas terapéuticas para la ELA.

La ELA fue descrita por primera vez por el neurólogo francés Jean-Martin Charcot en 1869 y por esta razón, se la conoce también como la enfermedad

de Charcot en Francia. Otros epónimos para la ELA son, en Estados Unidos la enfermedad de Lou Gehrig por el famoso jugador de béisbol del equipo de los Yankees que falleció a causa de la misma; o en Reino Unido, la enfermedad de la motoneurona (Gordon 2013).

Se trata de una enfermedad que afecta más a los hombres, siendo la proporción de casos entre hombres y mujeres de 3 a 1. En España, se estima que cada año se diagnostican alrededor de 900 casos nuevos (de 2 a 3 por día) y que el número total de enfermos ronda las 4.000 personas. La incidencia de esta enfermedad en la población española es de 1 por cada 50.000 habitantes y la prevalencia de 1/10.000 (FUNDELA, Fundación Española para el Fomento de la Investigación de la Esclerosis Lateral Amiotrófica).

Los síntomas clínicos de la ELA se ponen de manifiesto cuando las conexiones axonales fallan, es decir, cuando el axón de la motoneurona se retrae y se produce la denervación del músculo. Inicialmente esta retracción se compensa por medio del crecimiento de nuevos axones o dendritas y una re-inervación colateral por axones de neuronas que parecen ser más resistentes a esta degeneración. Sin embargo, a medida que la enfermedad va progresando, este mecanismo compensatorio no es suficiente y al final, se produce la muerte de la neurona (Saxena and Caroni 2011). Aunque en modelos animales este proceso ha sido ampliamente estudiado y caracterizado, en humanos todavía no se conoce el momento exacto en el que se produce (Robberecht and Philips 2013).

2.1.2 CLASIFICACIÓN

Tradicionalmente la ELA se ha clasificado en 2 categorías en función de su origen, la forma familiar o genética que supone alrededor del 5-10% de los casos (ELAF) y la esporádica (ELAE) que representa el 90% de los casos.

En la ELAF, el origen de la enfermedad es genético, normalmente relacionado con una herencia autosómica dominante, y en menor medida y de forma más excepcional, con una herencia autosómica recesiva, maternal (genes mitocondriales) o ligado al cromosoma X. Un gran porcentaje de los casos familiares (alrededor del 20%) se deben a mutaciones en el gen de la superóxido

dismutasa 1 (Cu/Zn SOD1) localizado en el cromosoma 21q22.1 y responsable de codificar la enzima SOD1 de carácter antioxidante (Andersen 2006). Otro de los genes asociados a la patogénesis de la ELA es el gen C9ORF72 (chromosome 9 open reading frame 72) localizado en el cromosoma 9p21. La expansión de la repetición del hexanucleótido GGGGCC en el primer intrón del gen se ha identificado recientemente como la mutación más común asociada a la demencia frontotemporal y a la ELA (40% de las formas de ELAF y 7% de las ELAE) (DeJesus-Hernandez et al. 2011; Renton et al. 2011). También se han identificado otras mutaciones en genes relacionados con procesos como la excitotoxicidad, la unión a RNA y/o el procesamiento de las proteínas, el transporte intracelular, la estructura del citoesqueleto y la función mitocondrial, y que pueden ser responsables de desencadenar la enfermedad.

En la forma ELAE se agrupan la mayor parte de los casos, y aunque el origen de la enfermedad es desconocido y se produce al azar, no se descarta que haya un componente genético. Se han publicado trabajos que lo han relacionado con la exposición a factores ambientales de riesgo como fertilizantes, pesticidas o metales pesados, accidentes cerebrales traumáticos o incluso, agentes víricos o bacterianos persistentes. Los avances en la investigación han permitido comprender las causas genéticas de la enfermedad, pero la contribución de los factores ambientales es más complicada de demostrar, a pesar de los estudios epidemiológicos a gran escala que se han realizado. El análisis de la relación entre la genética y los factores de riesgo ambientales hace pensar en un posible modelo que puede reproducir el efecto de un factor de riesgo ambiental que actúa sobre un componente genético previo a lo largo del tiempo (Al-Chalabi and Hardiman 2013).

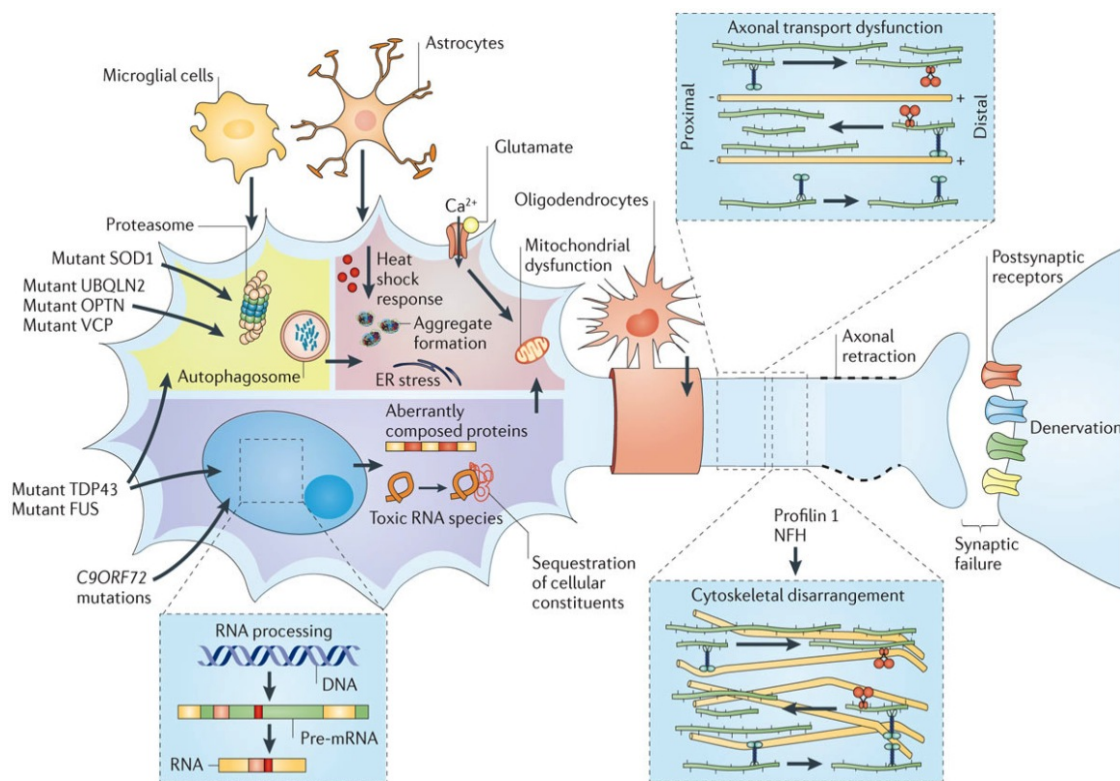
La enfermedad se presenta en la edad adulta entorno a los 45 años en los casos de ELAF, mientras que en los casos de ELAE aparece o bien más tarde (en torno a los 55 años) o antes de los 30 cuando se trata de las formas juveniles. Una vez se manifiestan los síntomas de la enfermedad, la muerte de estos enfermos se produce entorno a los 3-5 años de media; aunque algunos pacientes pueden morir a los pocos meses de diagnosticarles la enfermedad y otros llegan a sobrevivir décadas. Estas diferencias tanto en el comienzo como en la duración de la enfermedad, se producen incluso en las formas familiares que presentan la

misma mutación; lo que sugiere la existencia de otros factores que intervienen en el desarrollo de la enfermedad (Robberecht and Philips 2013).

2.1.3 ETIOPATOGENIA DE LA ELA

Los mecanismos moleculares concretos que provocan la muerte de las motoneuronas y desencadenan la enfermedad no se conocen todavía, aunque cada vez adquiere más importancia la hipótesis de que se trata de un proceso multifactorial. El desarrollo de modelos animales basados en mutaciones presentes en pacientes ha permitido identificar alteraciones en funciones celulares de la motoneurona que han dado pie a numerosas teorías sobre el origen de la enfermedad. Este es el caso de la primera mutación descubierta, que fue la del gen de la SOD1 (Rosen 1993), y que permitió crear uno de los modelos de ratones transgénicos más usados en el estudio de la ELA, el ratón SOD1G93A (Gurney et al. 1994).

FIGURA 1 Mecanismos moleculares de la patogénesis de la ELA (Robberecht and Philips 2013).



Los avances en la investigación de la ELA han permitido identificar nuevos genes causantes de la enfermedad relacionados con procesos como el tráfico endosomal, las vías de degradación de proteínas, el estrés oxidativo, la excitotoxicidad, el procesamiento del RNA, la agregación proteica, el transporte axonal y/o la disfunción mitocondrial (figura 1). Además, numerosos estudios han demostrado que existe una compleja interacción entre los distintos mecanismos. Otros aspectos relevantes en la patofisiología de la enfermedad son la participación de las células que se encuentran entorno a las motoneuronas (células de la glía o astrocitos), la intervención de determinadas vías de señalización molecular en la supervivencia y la muerte de las neuronas, la unión neuromuscular y el compartimento axonal distal (Ferraiuolo et al. 2011).

2.1.3.1 Excitotoxicidad

La excitotoxicidad inducida por glutamato, que es el principal neurotransmisor excitatorio en el sistema nervioso central, fue uno de los primeros mecanismos patogénicos propuestos, al presenciarse tanto en los pacientes de ELAF y ELAE, como en los modelos animales de la enfermedad. Dicha excitotoxicidad produce daño neuronal como resultado de una excesiva activación de los receptores de glutamato, que puede estar causada por un aumento de los niveles de glutamato a nivel sináptico, o por un aumento de la sensibilidad de la neurona al glutamato (Van Damme et al. 2005).

La pérdida de la homeostasis del calcio intracelular, junto con la activación de los sistemas enzimáticos relacionados con la proteólisis y la producción de ROS (especies reactivas del oxígeno), la alteración de la función mitocondrial y la producción de ATP son hechos claves en la excitotoxicidad (Arundine and Tymianski 2003).

En pacientes de ELAF y ELAE, se ha demostrado que la recaptación del glutamato por parte de los astrocitos está disminuida debido a una pérdida selectiva del transportador de glutamato astrogliol (EAAT2) en la corteza motora y en la medula espinal (Van Damme et al. 2005). Por otro lado, la pérdida de la conexión entre las motoneuronas altas y bajas produce una menor transcripción de EAAT2 al disminuir la expresión de los motivos NF- κ B de unión de fosfoproteínas (Yang et al. 2009). Además, la SOD1 provoca un daño oxidativo en el extremo C-terminal intracelular de EAAT2 y como consecuencia se

disminuye el transporte del glutamato (Trotti et al. 1999). Asimismo, la producción de la forma truncada de EAAT2 activa a la caspasa-3, proteína efectora de la apoptosis (Boston-Howes et al. 2006). Sin embargo, la sobreexpresión de EAAT2 en los ratones transgénicos de mSOD1 retrasa el inicio de los síntomas motores de la enfermedad (Guo et al. 2003).

Todas estas alteraciones de EAAT2 pueden interferir en la eliminación de glutamato, con lo que éste permanece en el medio y activa los receptores de forma continuada. Una vez activados los receptores, se produce una entrada masiva de calcio a la neurona que no se puede controlar porque no existen suficientes proteínas de unión a calcio. Como consecuencia de esta elevada concentración de calcio intracelular se activa la apoptosis, lo que provoca la muerte de la neurona y la degeneración.

Aunque la excitotoxicidad inducida por glutamato es un evento patológico característico en la ELA, queda por determinar si estos cambios representan un defecto primario responsable de la degeneración de la motoneurona, o si son resultado de la enfermedad (Musaro 2010).

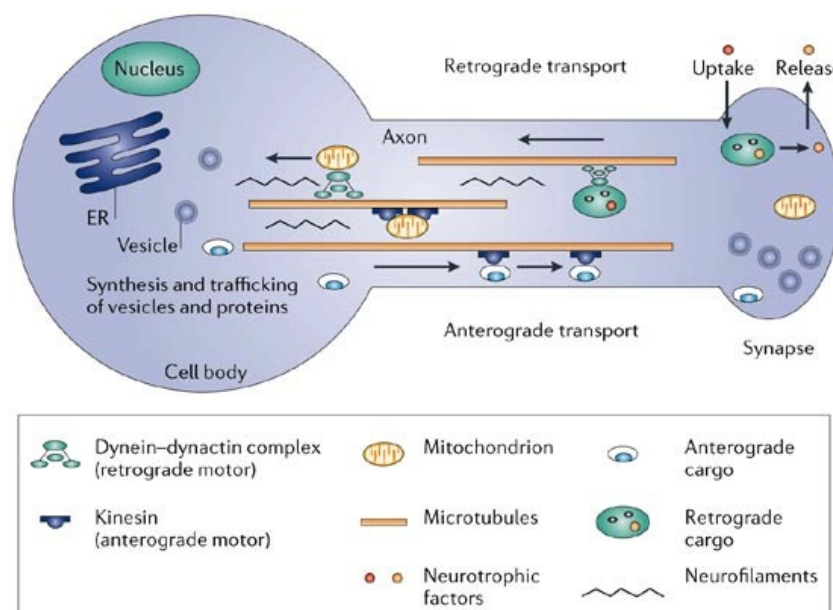
2.1.3.2 Alteración del transporte axonal

La alteración del transporte axonal constituye otro evento característico en la ELA (Sasaki et al. 2005) y puede, por ello, ser crucial en la patofisiología de la enfermedad. Las motoneuronas son células fuertemente polarizadas con largos axones, y el transporte axonal es necesario para el desplazamiento de componentes esenciales para la célula (RNA, proteínas y orgánulos celulares) a los compartimento axonales como son las estructuras sinápticas de la unión neuromuscular.

Se pueden producir dos tipos de transporte axonal: el anterógrado cuando se produce desde el soma hacia la unión neuromuscular y esta mediado por quinesinas dependientes de microtúbulos; y/o el retrógrado cuando va hacia el cuerpo celular y depende de las dineínas (figura 2) (Pasinelli and Brown 2006; Ferraiuolo et al. 2011). Cuando se produce una alteración en la estructura del citoesqueleto y el transporte axonal se ve afectado, el axón se puede retraer y producir la denervación de la neurona en el músculo, lo que promueve la muerte celular (Robberecht and Philips 2013).

En ratones SOD1G93A, el transporte axonal de las motoneuronas es deficiente desde los estadios tempranos de la enfermedad, tanto a nivel del transporte anterógrado como del retrógrado. Además, parece ser que esta afectación es específica de la carga que se transporta, como se aprecia en el caso del transporte anterógrado de las mitocondrias. Cuando surge un fallo en la función mitocondrial, se produce una disminución del transporte axonal mitocondrial, lo que podría afectar al transporte de otras sustancias por la falta de energía (Bilsland et al. 2010).

FIGURA 2 Disfunción del transporte axonal en la ELA (Pasinelli and Brown 2006).



La alteración del transporte axonal de las mitocondrias y la disminución del número de mitocondrias en el axón distal, junto con la disfunción mitocondrial, puede ocasionar la axonopatía por “dying-back” en la ELA como consecuencia del agotamiento energético (De Vos et al. 2007). Esta axonopatía por “dying-back” se ha descrito tanto en pacientes como en modelos animales (Fischer et al. 2004).

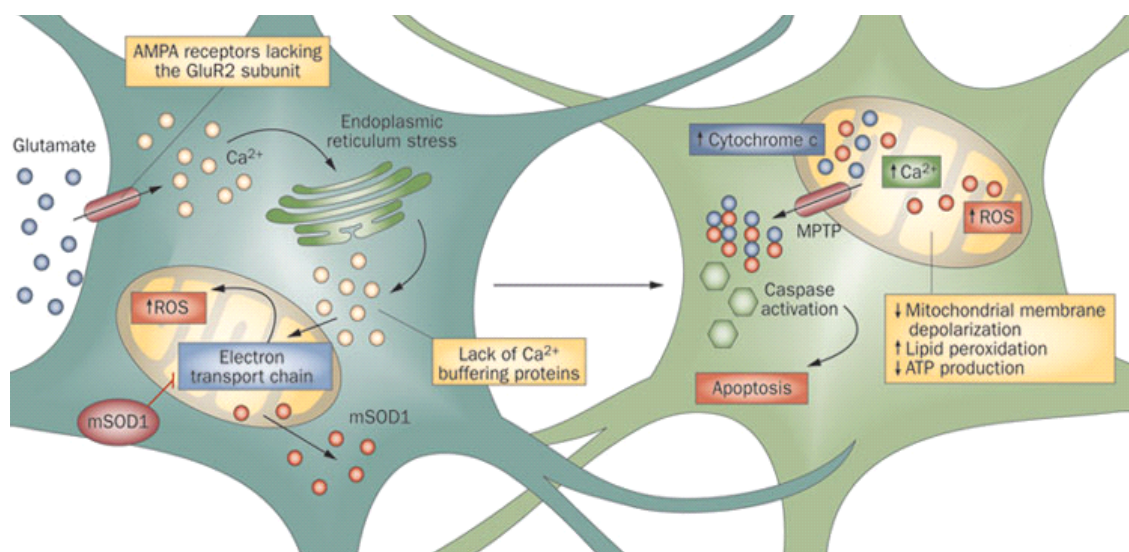
Por otro lado, se ha demostrado que existe una conexión entre la excitotoxicidad por glutamato y el fallo en el transporte axonal que podría contribuir al daño de la motoneurona en la ELA. En cultivos de neuronas, se ha revelado que el glutamato reduce el transporte axonal de neurofilamentos a

través de la activación de enzimas quinasas que los fosforilan (Ackerley et al. 2000; Turner et al. 2011).

2.1.3.3 Disfunción mitocondrial

La mitocondria posee un papel clave en la producción de energía intracelular, la homeostasis del calcio y el control de la apoptosis, además de participar en la producción de especies reactivas del oxígeno. Numerosos estudios han demostrado una relación entre la ELA y determinadas anomalías mitocondriales, si bien no se conoce el papel que estas anomalías pueden tener en el comienzo y desarrollo de la enfermedad. Esta relación ha sido ampliamente estudiada en los modelos animales que presentan la SOD1 mutada (figura 3)(Ferraiuolo et al. 2011).

FIGURA 3 Disfunción mitocondrial en la ELA (Ferraiuolo et al. 2011).



En ratones mSOD1, los agregados de la proteína SOD1 mutada que se localizan en vacuolas en el espacio mitocondrial intermembranoso junto con los depósitos adheridos a la membrana exterior provocan una disfunción mitocondrial selectiva en la médula espinal al impedir la importación de proteínas (Vande Velde et al. 2008). En tejidos procedentes de dichos ratones y de pacientes, se han encontrado también defectos en la función de la cadena respiratoria que se han asociado al daño oxidativo en proteínas y lípidos mitocondriales. Por lo

que los fallos detectados en la regulación del metabolismo energético podrían contribuir al daño de la motoneurona en la ELA (Ferraiuolo et al. 2011).

Además, se han descrito alteraciones en la morfología mitocondrial tanto en el músculo esquelético como en la médula espinal de pacientes (Sasaki and Iwata 2007). Incluso en algunos modelos de mSOD1 la vacuolización mitocondrial está presente en los estadios presintomáticos de la enfermedad, lo que evidencia una contribución importante de la mitocondria al inicio de la enfermedad (Wong et al. 1995).

También se ha demostrado que existe una conexión directa entre la mitocondria y la hipótesis de la excitotoxicidad a través de la homeostasis del calcio, al detectarse fallos en el intercambio de calcio entre el retículo endoplasmático y la mitocondria en los modelos de ELA (Grosskreutz et al. 2010). Asimismo, si la muerte de la motoneurona está mediada por la activación de las caspasas y de la apoptosis, el daño mitocondrial podría contribuir a este proceso (Sathasivam et al. 2005).

2.1.3.4 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se produce como consecuencia de una alteración en el balance entre la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS, reactive oxygen species) y su eliminación, junto con la capacidad del sistema biológico de eliminar o reparar el daño inducido por ROS. La acumulación del estrés oxidativo en neuronas durante el envejecimiento puede ser un factor importante que inclina la balanza de la capacidad para hacer frente a una agresión tóxica hacia el daño celular, lo que produce la muerte neuronal y por tanto, el comienzo de la neurodegeneración.

El descubrimiento de que un 20% de los casos de ELAF están causados por mutaciones en el gen SOD1 (Rosen 1993), que codifica una de las proteínas antioxidantes más relevantes, y el hecho de que se han descrito más de 150 mutaciones distintas susceptibles de ser patogénicas (Andersen and Al-Chalabi 2011), ha aumentado el interés en el papel del estrés oxidativo en la ELA. Las mutaciones de SOD1 que afectan a su actividad, pueden además aumentar el daño oxidativo y por ello, activar la apoptosis o causar alteraciones en la mitocondria como son la despolarización de la membrana, la disminución en la

actividad de los complejos respiratorios y la liberación de citocromo C (Musaro 2010)

En tejidos procedentes de autopsias de pacientes de ELAF y ELAE, se han detectado niveles elevados de proteínas, lípidos y DNA que presentan daño oxidativo (Shaw et al. 1995; Fitzmaurice et al. 1996; Shibata et al. 2001). Además, se han encontrado evidencias de daño oxidativo en RNA del sistema nervioso central tanto en pacientes como ratones mSOD1. En el modelo animal, el daño en el RNA se localiza en las motoneuronas y los oligodendrocitos en estadios tempranos presintomáticos de la enfermedad, y está asociado con una disminución de la expresión de la proteína. Además, determinados mRNA parecen ser más susceptibles a la oxidación, como son los que están involucrados en la cadena mitocondrial transportadora de electrones, la biosíntesis, plegamiento y degradación de proteínas, la mielinización, el citoesqueleto y las vías de glicolisis (Chang et al. 2008; Duan et al. 2010). El desarrollo del modelo celular de TDP-43 asociado a la ELA, ha demostrado que la presencia de TDP-43 mutado también provoca estrés oxidativo en líneas celulares de motoneurona (Duan et al. 2010).

Por otra parte, en los modelos animales de mSOD1, se ha demostrado la existencia de otras fuentes de estrés oxidativo que podrían causar la enfermedad. En las células de la microglia, se ha probado que la producción de superóxido mediada por NADPH oxidasa está incrementada a través de Rac1, lo que provoca el consiguiente aumento de la producción de ROS (Harraz et al. 2008). En el sistema nervioso central de pacientes de ELA, así como en los ratones mSOD1, se ha encontrado que la expresión de la NADPH oxidasa esta aumentada, y cuando las isoformas 1 o 2 de dicha enzima se silencian aumenta la supervivencia de los ratones SOD1G93A (Wu et al. 2006).

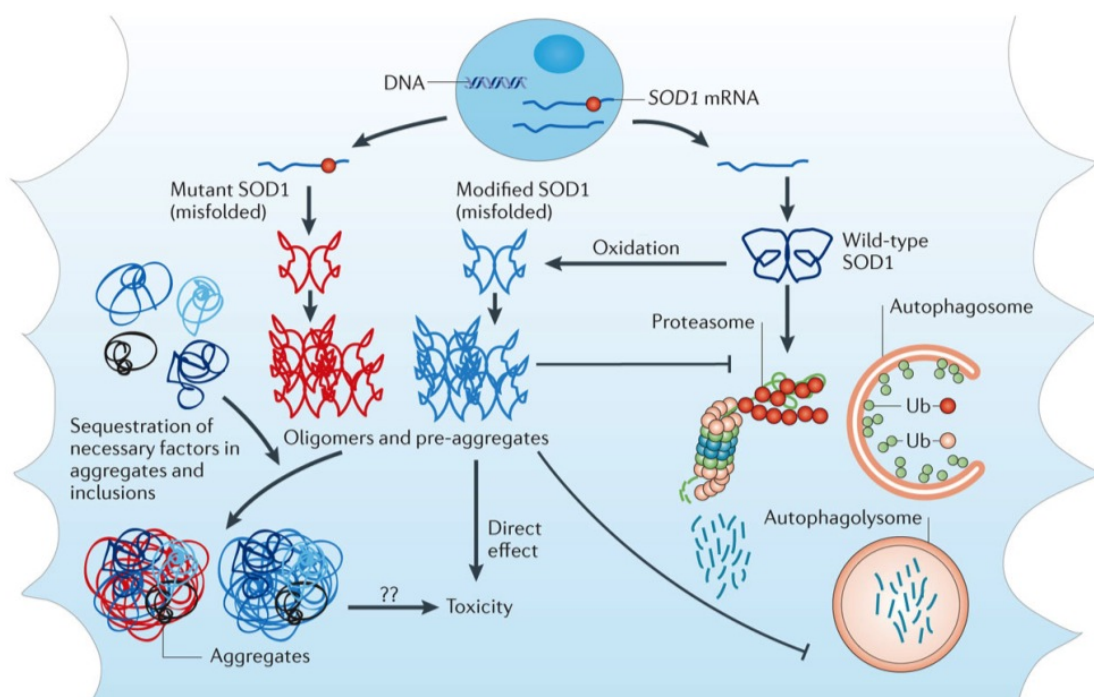
Además, el estrés oxidativo interactúa y aumenta otros procesos patofisiológicos que contribuyen al daño de la motoneurona y del músculo, incluyendo la excitotoxicidad, el fallo mitocondrial, la agregación proteica, el estrés del retículo endoplasmático y las alteraciones en la señalización de astrocitos y microglia (Barber and Shaw 2010; Musaro 2010).

2.1.3.5 Agregación proteica

En los últimos años, las teorías en cuanto al origen de la enfermedad de la ELA están relacionadas con la proteostasis celular, y son numerosos los trabajos que relacionan la acumulación de proteínas anormalmente plegadas con el desarrollo de enfermedad.

En el caso concreto del modelo animal mSOD1, las proteínas mutadas y mal plegadas se unen a ubiquitinas para ser eliminadas a través del proteasoma (Basso et al. 2006); sin embargo, parece ser que esto no sucede y las proteínas terminan escapando de este proceso regulatorio (figura 4). La acumulación de las formas mutadas de SOD1, primero en dímeros y más tarde en pre-agregados y agregados, podría tener un efecto directo tóxico sobre la respiración mitocondrial o el transporte axonal, o indirecto sobre la proteostasis celular, afectando tanto a la vía del sistema ubiquitin-proteasoma (UPS) como a la de los lisosomas/autofagia, lo que provocaría alteraciones en el correcto desarrollo de estos mecanismos (Bendotti et al. 2012; Chen et al. 2012).

FIGURA 4 Posible patogenia en el mecanismo de toxicidad inducido por agregados de SOD1 mal plegada (Robberecht and Philips 2013).



Por otro lado, las proteínas mal plegadas provocan la activación de la vía de respuesta del estrés del retículo endoplasmático (ER, endoplasmic reticulum). EL

primer paso en la respuesta a una proteína no plegada (UPR, unfolded protein response) conlleva el reconocimiento de dichas proteínas aberrantes por chaperonas residentes del ER que corrigen el plegamiento. Aunque la activación del sistema UPR se cree que es protectora para la célula, al menos en las fases iniciales del estrés celular, en ratones mSOD1 a los que les falta el factor de transcripción XBP1 (x-box binding proteína 1) clave para el UPR, se observó un aumento en la supervivencia, la activación de la degradación de proteínas asociadas al ER, el aumento de la autofagia y la disminución de agregados mSOD1 (Hetz et al. 2009).

Otra proteína clave para el estudio de la patobiología de la ELA asociada a la agregación proteica ha sido TDP43 (Neumann et al. 2006). EL TDP43 es una ribonucleoproteína localizada normalmente en el núcleo que une RNA a DNA y participa en procesos de transcripción, splicing y transporte de RNA. En situaciones de estrés como el ayuno o el estrés oxidativo, aparece localizada en el citoplasma. Si la situación se resuelve, los gránulos de estrés son eliminados por chaperonas y disgregasas que liberan el TDP43 para que pueda retornar al núcleo; mientras que si se mantiene, los gránulos pueden llegar a acumularse de modo irreversible. Como resultado final de esta circunstancia, se producen fallos en el splicing del mRNA que conllevan la degradación de RNAs o la acumulación de proteínas con secuencias aberrantes en el núcleo. Además, los fragmentos tóxicos de RNA pueden abandonar el núcleo y provocar efectos tóxicos en el citoplasma (Dewey et al. 2012). Sin embargo, recientemente se ha desarrollado un modelo murino cuya expresión de TDP43 mutado induce la ELA sin formación de agregados o procesamiento anormal de la proteína mutada, e incluso, sin la salida de TDP43 del núcleo (Arnold et al. 2013), lo que implicaría una vía alternativa independiente de la agregación proteica.

Otra de las mutaciones causantes de ELA asociadas a la agregación proteica se ha descrito en el gen que codifica VCP (valosin containig protein) (Johnson et al. 2010). Las mutaciones en el gen VCP se describieron por primera vez en pacientes con miopatía por cuerpos de inclusión con la enfermedad de Paget de comienzo temprano y demencia frontotemporal. La proteína VCP es una chaperona ubiquitina-sensible multifuncional que participa en los procesos de desdoblamiento de proteínas y disgregación de complejos, y en la degradación de proteínas a través del sistema proteasomal o de la autofagia. En el caso

particular de la autofagia, esta proteína interviene en la fusión del lisosoma con el autofagosoma. A través de la región N-terminal de VCP, se produce la unión a sustratos poliubiquitinizados, y es precisamente en esta región donde se han identificado el mayor número de mutaciones en el caso de la ELA (Johnson et al. 2010).

En relación directa con la agregación proteica, como ha quedado demostrado en el caso de la proteína VCP, se encuentran los sistemas de “limpieza” celular como son el proteasoma y la autofagia. Dichos procesos han sido ampliamente estudiados en enfermedades neurodegenerativas que cursan con la presencia de agregados proteicos como son el Alzheimer o la ELA, ya que una alteración en el funcionamiento de los mismos podría ser la causa de la enfermedad. Ambos procesos son objeto de estudio en apartados posteriores de esta tesis doctoral.

2.1.3.6 Neuroinflamación

En el modelo animal mSOD1, diversos trabajos han demostrado que las células de la microglia y los astrocitos que rodean a la motoneurona contribuyen al comienzo y la progresión de la enfermedad de la ELA.

El proceso por el cual las células de la glia van aumentando progresivamente su actividad conforme progresa la enfermedad tanto en pacientes como en los modelos animales se denomina neuroinflamación. Esta reacción puede tener consecuencias protectoras o perjudiciales (Philips and Robberecht 2011).

Los trabajos realizados tanto *in vitro* como *in vivo*, han puesto de manifiesto que los astrocitos procedentes de ratones mSOD1 y de pacientes con ELAE pueden inducir la muerte de las motoneuronas. Además, cuando se produce una disminución de SOD1 en los astrocitos de estos pacientes, se anula dicha toxicidad (Haidet-Phillips et al. 2011). Este descubrimiento demuestra el papel relevante que tiene la SOD1 en la ELAE.

Por otro lado, la activación de los astrocitos parece ser un hecho clave en la inflamación. En el caso concreto de cultivos de astrocitos procedentes de ratones SOD1G93A, son estas células las que realizan la secreción de mediadores inflamatorios como son la prostaglandina E2, los leucotrienos B4 y el óxido nítrico tanto en condiciones basales como activadas (Hensley et al. 2006).

Otros indicadores de la existencia de inflamación en la patología del sistema nervioso central de los enfermos de ELA, es la presencia de células de la microglia activadas y de linfocitos infiltrados. En el líquido cefalorraquídeo de pacientes de ELA se ha detectado la presencia de mediadores proinflamatorios como son la proteína quimioatrayente de monocitos 1 y la interleuquina 8; mientras que en sangre se han encontrado indicadores de la activación de la respuesta inmune (Mantovani et al. 2009).

En relación a la respuesta inmune, el estudio realizado en los ratones mSOD1 consistente en la inyección intraperitoneal del anticuerpo monoclonal específico de CD40L (ligando expresado en células T que activan la respuesta inmune), MR1; se produce un retraso en el comienzo de la enfermedad, aumenta la supervivencia, y se reduce la astrogliosis del sistema nervioso central y la activación de la microglia (Lincecum et al. 2010).

Otra célula no neuronal que interviene en la patología de la ELA es el oligodendrocito, que participa en el mantenimiento del axón al proveer a la neurona de lactato a través del transportador de lactato monocarboxilado MCT1. Experimentos realizados, tanto *in vitro* como *in vivo*, han revelado que cuando el transportador MCT1 falta, se produce la degeneración de la motoneurona. Así, en pacientes y ratones con ELA, se ha demostrado que la disminución de la expresión de MCT1 probablemente contribuya a la pérdida de la motoneurona (Lee et al. 2012).

2.1.3.7 Procesamiento de RNA

La identificación de TDP-43, proteína de unión RNA-DNA, como el mayor componente de las inclusiones ubiquitinadas en la ELA; así como de FUS, ha puesto de manifiesto el interés en la alteración del procesamiento de RNA como un posible mecanismo patofisiológico de la enfermedad. Actualmente se desconoce si el daño en la motoneurona está causado por la pérdida de función de las proteínas en el procesamiento de RNA, o por una ganancia de función tóxica o por ambas.

EL TDP43 es una proteína predominantemente nuclear implicada en múltiples aspectos del procesamiento del RNA, incluyendo la regulación postranscripcional, el splicing alternativo y el procesamiento de microRNAs. Tal y como se ha descrito en el apartado de la agregación proteica, las inclusiones

citoplasmáticas de TDP43 no siempre están presentes en casos de la ELA asociada a mSOD1 o a FUS, lo que puede significar que se esté produciendo una cascada neurodegenerativa alternativa en estos casos genéticos de ELA. Las mutaciones en *TARDBP*, gen que codifica la proteína TDP43, son responsables del 4% de las ELAF y del 1.5% de las ELAE (Mackenzie et al. 2010). La mayoría de las mutaciones residen en el exón 6 que codifica un dominio rico en glicinas involucrado en la interacción proteína-proteína y posiblemente en el transporte nuclear. De este modo, la expresión de TDP43 mutada en células en cultivo produce la salida de dicha proteína al citoplasma y su localización en gránulos de estrés (Liu-Yesucevitz et al. 2010).

En relación a la proteína FUS, se trata de una proteína de unión RNA-DNA que participa en la regulación transcripcional, en el procesamiento del RNA y de los microRNAs y en el transporte del mRNA. El gen de FUS está mutado en el 4% de las ELAF y en menos del 1% de las formas espontáneas (Mackenzie et al. 2010). La mayor parte de las mutaciones están localizadas en los exones 13-15 que codifican regiones ricas RGG (arginina-glicina-glicina) y la señal de localización nuclear. Estas mutaciones rompen la localización nuclear de FUS mediada por la proteína transportin e induce la formación de gránulos de estrés que contienen FUS en el citoplasma (Ito et al. 2011).

Ambas proteínas, TDP43 y FUS contienen 2 dominios de reconocimiento de RNA que les permite participar en el transporte de mRNA. La mutación de dichas proteínas podría contribuir al daño en la motoneurona por la pérdida del transporte de mRNA en el axón. Además, la disminución de la expresión y la función nuclear de estas proteínas podría interferir en aspectos del procesamiento del RNA como el splicing del pre-mRNA, la salida nuclear del mRNA y/o el procesamiento de los RNAs no codificantes (Ferraiuolo et al. 2011).

Otras evidencias en la disfunción del metabolismo del RNA en la ELA se han descrito en el caso de la angiogenina (ANG) y la DNA-RNA helicasa senataxina (SETX). La expresión de ANG está aumentada durante la hipoxia para inducir la angiogenesis, participa como ribonucleasa y regula la transcripción del RNA ribosomal. El estudio realizado en los ratones mSOD1 ha demostrado que la sobreexpresión de ANG aumenta la supervivencia (Kieran et al. 2008), lo que podría deberse a que ANG inhibe la translocación de factores que inducen la apoptosis al núcleo (Li et al. 2012). En cuanto a SETX, esta proteína se ha

asociado a mutaciones presentes en las formas de ELAF juvenil. La proteína SETX forma parte de un gran complejo de ribonucleoproteínas que se encargan de la reparación del DNA en respuesta al estrés oxidativo y el procesamiento del RNA (Chen et al. 2004), pero el mecanismo por el cual causa la enfermedad de la ELA todavía no se ha descubierto.

2.1.3.8 Tráfico endosomal

La endocitosis es el proceso por el cual moléculas extracelulares son capturadas en la superficie de la membrana celular e introducidas en el interior de la célula. Una vez en el interior celular, dichas moléculas entran en un sistema complejo de orgánulos hasta llegar a su destino final; a este proceso se le denomina tráfico endosomal.

Se han descrito alteraciones en este proceso relacionadas con algunos tipos de ELAF, como es el caso de las mutaciones en la alsina presentes en una forma autosomal recesiva de comienzo juvenil (Yang et al. 2001). La alsina es una proteína que participa en la fusión y el tráfico endosomal, así como en el crecimiento de las neuritas. En modelos celulares, se ha descrito que la pérdida de la función de la alsina causa una reducción en la movilidad endosomal, un aumento de la conversión de endosomas en lisosomas y un aumento en la degradación de los productos que se encuentran en su interior como ocurre con los receptores de glutamato internalizados (Lai et al. 2006).

Además, se han identificado otras mutaciones relacionadas con variantes raras de la ELA como son la optineurina, VAPB (vesicle associated membrane protein-associated protein B) o VCP (Ferraiuolo et al. 2011). La optineurina, por ejemplo, es un inhibidor nuclear del factor de regulación κ B (NF- κ B) implicado en el tráfico vesicular, la respuesta inmune y la regulación transcripcional. Esta proteína se une a la proteína RIP (ribosome inactivating protein) ubiquitinada para impedir la activación de NF- κ B. Se han descrito mutaciones sin sentido, recesivas deletéreas y de pérdida de sentido en la proteína optineurina en casos tanto de ELAF como de ELAE (Maruyama et al. 2010).

2.1.3.9 Epigenética por metilación del DNA

La metilación del DNA es un mecanismo epigenético de regulación génica que consiste en la unión de grupos metilo a una citosina situada previa y contiguamente a una, lo que provoca un cambio estructural en la cromatina. Un alto grado de metilación o hipermetilación se asocia con un silenciamiento de los genes.

El análisis epigenético llevado a cabo en muestras de cerebro de pacientes con ELAE, ha identificado una serie de genes relacionados con la homeostasis del calcio, el estrés oxidativo y la excitotoxicidad que presentan variaciones en la metilación del DNA. Esta modificación en los niveles de metilación puede tener un papel importante en la patogénesis de las formas de ELAE, al observarse distintos perfiles de metilación en los pacientes (Morahan et al. 2009).

En relación a la homeostasis del calcio, se han detectado modificaciones en la metilación de genes relacionados con los canales del calcio como *RYR3* o con el intercambiador sodio-calcio *SLC24AE*. Además, se ha descrito que los genes *SLC17A7* y *ACCN1* relacionados con la excitotoxicidad, así como *MSRA* o *PTGS1* que tienen un papel protector en el tejido nervioso frente a los daños causados por el estrés oxidativo entre otros aparecen hipometilados (Morahan et al. 2009).

2.1.4 IMPLICACIÓN DEL MUSCULO EN LA ELA

Previo a la aparición de los primeros signos de degeneración en la motoneurona, ya se han descrito alteraciones en el tejido muscular que ponen de manifiesto la relevancia que tiene dicho tejido en la ELA. De este modo se ha observado que en el músculo se produce un incremento en la captación de nutrientes, modificaciones en el metabolismo de los carbohidratos y los lípidos, y alteraciones en las funciones mitocondriales (Dupuis et al. 2004; Zhou et al. 2010; Dupuis et al. 2011).

La sobreexpresión de mSOD1 en el músculo esquelético de ratones produjo alteraciones motoras que se manifestaron en forma de espasticidad o hiperreflexia junto con anomalías en las uniones neuromusculares y axonopatía distal. Además, la expresión de mSOD1 de modo ubicuo causa atrofia muscular seguida de la alteración de las uniones neuromusculares y una degeneración

axonal retrógrada para desembocar finalmente en la muerte de la motoneurona (Wong and Martin 2010; Dobrowolny et al. 2011).

Por otro lado, la expresión del factor de crecimiento IGF-1 (insulin-like growth factor 1) en el músculo de ratones SOD1G93A produjo una disminución del catabolismo presente en dicho tejido, la atenuación de los síntomas, un retraso en la progresión de la enfermedad y un aumento en la esperanza de vida de 30 días en los ratones. Además, se detectó una disminución de la atrofia muscular debida a la activación de las células satélite y una conservación de las uniones neuromusculares y de la función neuronal en todas las etapas de la enfermedad (Dobrowolny et al. 2008)

Asimismo, el análisis por medio de un microarray de muestras procedentes de ratones SOD1G93A ha permitido determinar alteraciones en genes relacionados con la producción de ATP, la degradación de proteínas y con procesos de crecimiento, diferenciación y muerte celular (Gonzalez de Aguilar et al. 2008).

Por último estudios recientes realizados en nuestro grupo han puesto de manifiesto que existen problemas en las células satélites musculares desde los estadios más tempranos de la enfermedad y que se mantienen a lo largo de la misma (Manzano R. Caracterización de las células madre satélite musculares en un modelo murino de Esclerosis Lateral Amiotrófica. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza. 2011).

2.2 PROTEASOMA

En el citosol y el núcleo de las células eucariotas, el principal sistema de degradación de proteínas es el sistema ubiquitin-proteasoma o UPS (ubiquitin-proteasome system). La maquinaria proteolítica de este sistema es el proteasoma, que se encarga de controlar la concentración de cientos de proteínas reguladoras y eliminar las proteínas mal plegadas o dañadas de la célula. El UPS es el sistema responsable de degradar entre el 80 y el 90% de las proteínas aberrantes.

La importancia de la degradación proteica dentro de las células y el rol de la ubiquitina en dicho proceso fue reconocido con el Premio Nobel de Química en 2004, otorgado a Aarón Ciechanover, Avram Hershko e Irwin Rose.

El proteasoma es una partícula grande constituida por alrededor de 33 subunidades y con un peso molecular aproximado de 25MDa. Se encuentra dividido funcional y estructuralmente en 2 partes: una partícula central o core con forma cilíndrica denominada 20S, y una o dos partículas reguladoras 19S localizadas en los extremos. La partícula 20S está compuesta por cuatro anillos heptaméricos, dos centrales formados por subunidades β y uno a cada extremo de los centrales formado por subunidades α (Goldberg 2003). Las proteínas para ser degradados deben acceder a la cavidad formada por los anillos β a través de un poro localizado en el anillo α . Este poro es lo suficientemente estrecho como para impedir el paso de las proteínas plegadas; y además, se encuentra tapado por el extremo N-terminal de las subunidades α .

La unidad 20S se activa por medio de las llamadas partículas reguladoras que se localizan en el extremo de la estructura e inducen los cambios conformacionales que permiten la apertura del poro. De las cuatro partículas reguladoras que se han identificado (11S, PA200, Cdc48 y 19S), la más conocida es la 19S. La partícula 19S está formada por 19 subunidades, tiene un peso molecular de aproximadamente 900 kDa y es capaz de reconocer sustratos desplegados y transportarlos a la partícula 20S para que se degraden en

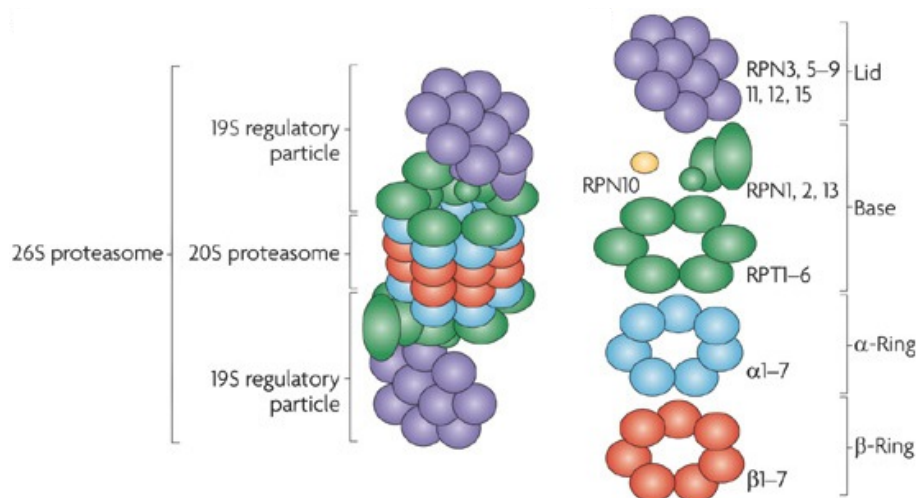
pequeños péptidos. El complejo formado por la subunidad 20S y una o dos partículas reguladoras 19S, se denomina proteasoma 26S, y parece ser el tipo de proteasoma más abundante en las células (Inobe and Matouschek 2014).

Este sistema de degradación de proteínas interviene en casi todos los procesos intracelulares, incluyendo el control y la progresión del ciclo celular, la transcripción y la traducción, el control de calidad de las proteínas (PQC), la reparación del DNA, la apoptosis, la endocitosis mediada por receptores y la respuesta al estrés celular. Por lo tanto, no es de extrañar que intervenga en procesos fisiopatológicos como el cáncer, las enfermedades autoinmunes y neurodegenerativas, o incluso, las enfermedades virales (Lilienbaum 2013).

2.2.1 ESTRUCTURA Y MECANISMO DE ACCIÓN DEL PROTEASOMA 26S

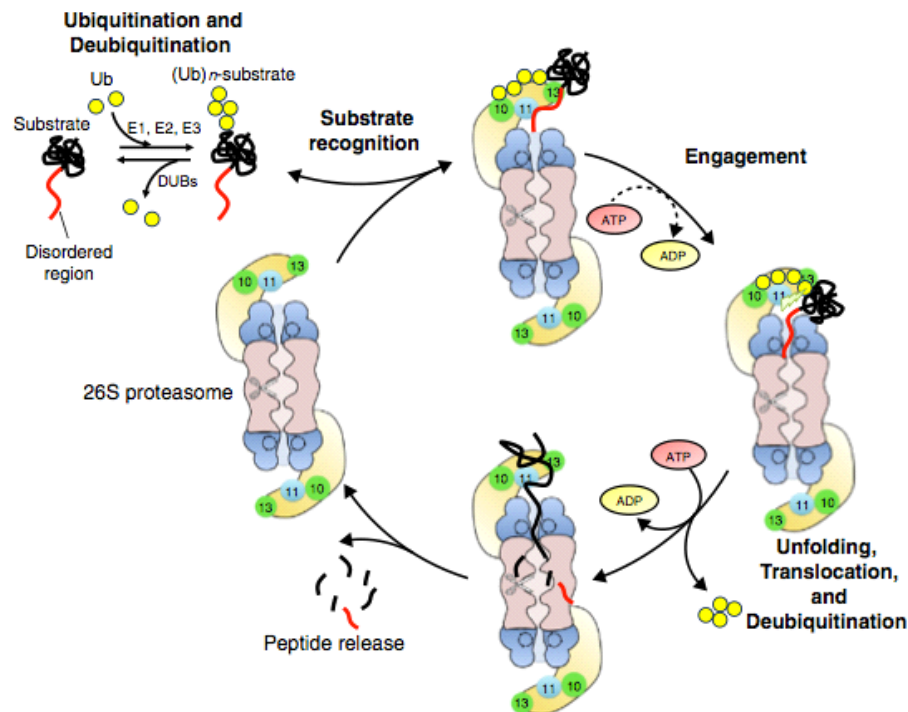
El proteasoma 26S es un complejo multiproteico con forma de barril y dependiente de ATP en el que se diferencian 2 regiones. El centro catalítico 20S con actividad proteasa (descrito en el apartado anterior), y 2 subunidades reguladoras 19S en ambos extremos de la estructura y responsables de la apertura de la estructura, el reconocimiento, el despliegue y la translocación de las proteínas ubiquitinadas (figura 1) (Lilienbaum 2013).

FIGURA 1 Estructura del proteasoma 26S (Murata et al. 2009).



La zona central de la partícula 19S está formada por seis subunidades ATPasa o Rpt (Rpt1-Rpt6) que se encargan de proveer de sustratos a las zonas proteolíticas del proteasoma. Para unir el anillo formado por las subunidades Rpt intervienen 2 subunidades de mayor tamaño denominadas Rpn1, localizada en la zona exterior del anillo, y Rpn2 que aparece en la zona superior. La partícula 19S completa su estructura con un conjunto de 9 subunidades Rpn localizadas en la zona más exterior y cuya forma recuerda a la de una “tapa” (Finley 2009; Inobe and Matouschek 2014).

FIGURA 2 Sistema de degradación de proteínas por el proteasoma 26S (Inobe and Matouschek 2014).



Para que se produzca la eliminación de las proteínas aberrantes, el proteasoma primero reconoce el sustrato ubiquitinado a través de los receptores Rpt10 y Rpt13 que se encuentran en la subunidad 19. Tras la unión del proteasoma y la proteína, ésta se va desdoblado a medida que se produce la translocación a la cavidad central de la partícula 20S (figura 2). Antes de que se lleve a cabo la degradación de la proteína, las ubiquitinas unidas a la misma se liberan por medio de la partícula Rpn11 a través de un proceso dependiente de ATP (Wong and Cuervo 2010).

En los últimos años, se ha descubierto que el proteosoma es capaz de llevar a cabo procesos de degradación alternativos al proceso con proteínas poliubiquitinadas dependiente de ATP, anteriormente descrito, como son el proceso independiente de proteínas ubiquitinas, el independiente de ATP por el proteosoma 20S sin la región 19S y/o la modificación de proteínas sin degradación. Además, se han identificado una serie de proteínas que realizan el papel de las ubiquitinas, y de señales capaces de iniciar la degradación como es el caso de las regiones “degron” que se localizan en la propia secuencia de la proteína. En el caso concreto de los mecanismos independientes de ATP, son las mismas zonas hidrofóbicas de las proteínas mal plegadas que quedan expuestas, las que realizan una función similar a la que desempeñan las ubiquitinas. El proteosoma, así mismo, puede intervenir en procesos de modificación de proteínas que no implican la degradación de las mismas, como ocurre por ejemplo con determinados factores de transcripción (Lilienbaum 2013).

En general, el sistema proteasomal se caracteriza por ser un proceso altamente selectivo y rápido, ya que generalmente reconoce solamente sustratos ubiquitinados.

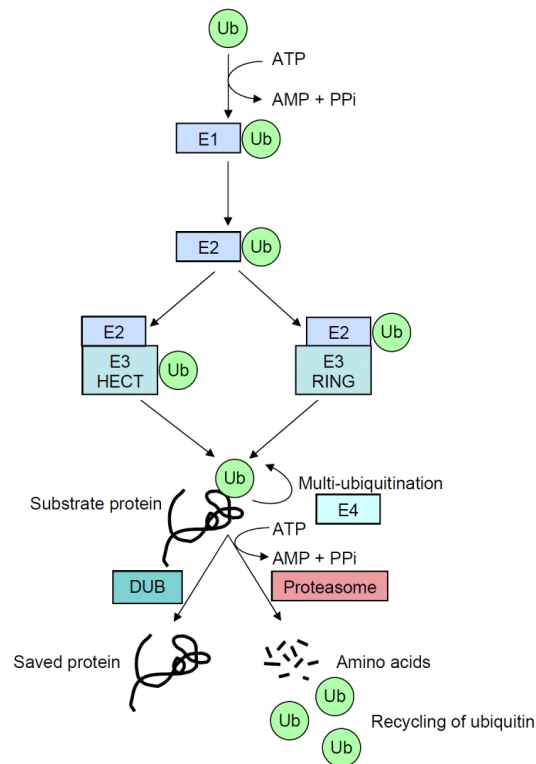
2.2.2 PROCESO UBIQUITINACIÓN

La ubiquitinación consiste en la unión covalente de ubiquitinas por medio de un enlace isopeptídico al extremo carboxi de las proteínas a través de los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina (Komander et al. 2009). Las ubiquitinas son pequeñas proteínas globulares ubicuas (de ahí su nombre) de aproximadamente 8.5 kDa, con secuencias altamente conservadas y que se localizan en todos los organismos eucariotas.

En el proceso de ubiquitinación participan 3 enzimas: la E1 activante (ubiquitin-activating enzyme) que hidroliza ATP y forma un enlace tioéster entre ella y la ubiquitina, la E2 conjugadora (ubiquitin-conjugating enzyme) que recibe la ubiquitina de E1 y forma un enlace tioéster similar con la ubiquitina, y la enzima E3 ligante (ubiquitin-ligase enzyme) que une la enzima E2 al sustrato y trasfiere la ubiquitina al mismo (figura 3)(Rubinsztein 2006) (Hershko and Ciechanover 1998).

Hasta el momento se han identificado 2 genes que codifican la enzima E1, al menos 37 para E2 y más de 1000 para la ligasa E3 (Pickart and Eddins 2004). Esta gran variedad de isoformas y las distintas preferencias de unas hacia otras en función del contexto celular, genera un amplio número de combinaciones complejas y posibles de estas tres enzimas ligasas.

FIGURA 3 Mecanismo de ubiquitinación (Lilienbaum 2013)



A través de este mecanismo de señalización puede unirse una única ubiquitina (monoubiquitinización) o varias (poliubiquitinización), en uno o varios sitios específicos, e incluso participar más de un tipo de ellas. En función de cómo se produce la ubiquitinación, el destino de la proteína variará ya que son las ubiquitinas las proteínas responsables de determinar cuándo y en qué orden se producirá la degradación de los sustratos (Wong and Cuervo 2010).

Para añadir más complejidad a este proceso, existen enzimas desubiquinizadoras (DUBs, deubiquitinating enzymes) que pueden revertir el proceso de degradación por ubiquitinas al eliminar dichos residuos de sustratos tanto monoubiquitinados como poliubiquitinados antes de que se produzca su acceso al proteasoma (Amerik and Hochstrasser 2004). Este proceso permite por un lado generar ubiquitinas libres para mantener su concentración celular que es

limitada, y por otro, dar la oportunidad a proteínas que presentan un correcto plegamiento de escapar de la degradación (Kalderon 1996).

Por último, cabe destacar el hecho de que algunas proteínas no requieren la unión a ubiquitinas para ser degradadas por el proteasoma, pero la relevancia de este proceso *in vivo* todavía no está claro (Murakami et al. 1992).

En relación con el proteasoma existen una serie de enfermedades neurodegenerativas, entre ellas la ELA o el Huntington, que tienen en común la acumulación de agregados proteicos ubiquitinados en el interior de las células. Esta acumulación puede ser debida o bien a que se produce un aumento en la expresión de proteínas, o a que la actividad de degradación del proteasoma disminuye (Wong and Cuervo 2010).

2.2.3 PROTEASOMA Y PATOGENESIS DE LA ELA

Los trabajos que han estudiado y demostrado que existe una relación directa entre el proteasoma y la ELA son numerosos, como se demuestra en la tabla 1, y abarcan una gran variedad de proteínas asociadas a la enfermedad.

En la ELA, la presencia de inclusiones proteicas ricas en ubiquitinas en las neuronas es un hecho neuropatológico presente no solo en pacientes de ELAF y ELAE, sino también en los modelos celulares y animales de la enfermedad (Bendotti and Carri 2004). Además, tanto en los pacientes de ELA como en los modelos animales, se ha descrito no solo la presencia de estos agregados, sino también de cambios en las subunidades del proteasoma o en las proteínas relacionadas con el UPS (Cheroni et al. 2005). Así mismo, algunas mutaciones de genes asociados a las ELAF afectan a proteínas que interactúan directamente con el UPS (como puede ser VCP) o que son degradadas por el proteasoma, como es el caso de SOD1, TDP43 y la optineurina.

Estudios realizados en el modelo murino SOD1G93A han demostrado que la formación de agregados ubiquitinados se correlaciona con la progresión de la enfermedad, y que dichas inclusiones ricas en SOD1 se encuentran parcialmente ubiquitinadas (Basso et al. 2006). Este hecho pone de manifiesto que la ubiquitinación de SOD1 es un proceso secundario a la formación de los agregados y que no es necesaria para el proceso de agregación. Además, las

proteínas SOD1 mono u oligoubiquitinadas no son reconocidas eficientemente por el proteasoma, lo que produce la acumulación de formas aberrantes y la disfunción del UPS. De hecho, en ratones SOD1G93A la acumulación intracelular de proteínas en la médula espinal correlaciona con una disminución de las subunidades constitutivas del proteasoma que se detecta selectivamente en las astas ventrales durante la progresión de la enfermedad (Cheroni et al. 2005). Estos hallazgos han sido también ratificados en otros modelos celulares y animales de determinadas formas de ELAF asociadas a SOD1 (Kabashi et al. 2008).

TABLA 1 Proteínas asociadas a la ELA y el UPS (Bendotti et al. 2012)

| PROTEINA | FUNCION | IMPLICACION |
|---|---|---|
| SOD1 MUTADA | Enzima antioxidante con ganancia de función comparada a WT | Degradada por proteasoma |
| DORFIN | Ligasa E3 ubiquitin (tipo dedo RINGER) | En inclusiones en modelos murinos y pacientes |
| UBIQUITIN | Proteína marcadora de degradación dependiente de ubiquitina | En inclusiones y aumentada en médula espinal de pacientes |
| NEDL1 | Ligasa E3 ubiquitin (tipo HECT) | Media ubiquitinación de SOD1 y se localiza en inclusiones |
| CHIP | Enzima E4 dependiente de chaperona | Localizada en inclusiones de modelos murinos |
| SUMO-1 | Proteína como ubiquitin | Modifica SOD1 en la Lys75 aumentando su estabilidad |
| UCHL1 | Enzima de-ubiquitinizante | Depleción de transcritos en el córtex motor de pacientes |
| UBIQUILIN 2 | Proteína como ubiquitin ubiquilin 2 | Une 19S y las cadenas poli-ubiquitinadas |
| Sub β constitutiva proteasoma 20S | Degradación proteína | Disminuida en médula espinal de ratones |
| Sub β inducible proteasoma 20S | Degradación proteína y producción de péptidos antigénicos | Aumentada en médula espinal de ratones |
| Sub $\alpha 5$ proteasoma 20S | Cámara confinamiento proteolítico | Disminuida en médula espinal de ratones |
| Proteasoma 19S | Complejo regulador del proteasoma 26S | Disminuida en médula espinal de ratones |
| VCP | ATPasa requerida para marcar cadenas multi-ubiquitinadas | Mutada en ELAF autosómica dominante |
| TDP43 | Regulación de factores de transcripción y splicing RNAm | Degradada por proteasoma y acumulada en pacientes |
| Gp78 | Ligasa E3 ubiquitin implicada en la degradación asociada a ER | Interacciona y promueve la degradación de hSOD1 |
| MITOL | Enzima E3 mitocondrial | Promueve la degradación de mSOD1 mitocondrial |

Esta disfunción del sistema UPS en el modelo SOD1G93A parece tener cierta especificidad tisular al producirse exclusivamente en la motoneurona (Cheroni et al. 2009). La generación de un ratón doble transgénico para SOD1G93A y el indicador de sustratos UPS, UbG76V, ha demostrado que en estadios sintomáticos de la enfermedad se produce una acumulación de UbG76V en motoneuronas espinales y craneales. Este fenómeno es debido a una degradación deficiente por parte del UPS, y va acompañada por una acumulación en dichas motoneuronas de marcadores de patogénesis de la ELA como son los neurofilamentos ubiquitinados y fosforilados; estos hechos sugieren que el fallo del UPS tiene un efecto perjudicial en estas células (Cheroni et al. 2009).

Por otra parte, el empleo de la proteína YFPu, que es un indicador de la actividad del proteasoma, ha permitido estudiar el efecto que la proteína mSOD1 produce por sí misma sobre el proteasoma. La proteína YFPu induce el desplegamiento de las proteínas y cuando la actividad del proteasoma es normal es degradada rápidamente. Se ha estudiado en células de motoneurona NSC34 el efecto que SOD1G93A mutada y WT ejerce sobre la actividad del proteasoma (Crippa et al. 2010). Los datos han demostrado que la sobreexpresión de mSOD1 produce una acumulación significativa de YFPu; y por otro lado, que mientras la forma WT de SOD1 está presente en el citoplasma y en el núcleo de las células NSC34 y en ratones transgénicos, la forma mutada sólo se encuentra en el citoplasma, lo que indica que ambas proteínas tienen distinto efecto en el proteasoma nuclear o citoplasmático (Sau et al. 2007). Además el análisis de la actividad del proteasoma en estos dos compartimentos subcelulares ha determinado que el fallo del proteasoma se produce solamente en el citoplasma.

Por otro lado se ha estudiado y comparado el comportamiento molecular de mSOD1 en distintos tipos celulares, en concreto en la línea NSC34 de motoneuronas y la C2C12 de músculo. Los resultados indican que hay un patrón de distribución de las formas mutadas y WT similar en la línea muscular. Esto podría ser debido a que los procesos de limpieza funcionan mejor en el músculo que en las motoneuronas, lo que evidencia el hecho de que se produzca la acumulación de YFPu en NSC34 y no en C2C12; es decir, la mSOD1 perjudica la

actividad del proteasoma únicamente en las motoneuronas NSC34 (Onesto et al. 2011).

Además, las células NSC34 se caracterizan por tener un potencial autofágico en condiciones basales mayor que las C2C12 al presentar niveles altos de mRNA de LC3 que es el marcador por excelencia de la autofagia. Sin embargo, la activación de LC3 es mayor en las células musculares que en las motoneuronas, lo que sugiere que la activación de la autofagia es mayor en las C2C12 (Onesto et al. 2011). En conjunto, los altos niveles de mRNA de LC3 y la baja activación de esta proteína en las células NSC34 sugieren que la eficiencia de la activación de la autofagia es baja en las motoneuronas. Este hecho podría explicar por qué las células musculares presentan una mayor resistencia que las motoneuronas en relación a la acumulación de proteínas mSOD1 mal plegadas en la ELA.

Gracias a los hallazgos en relación al proteasoma y la ELA descritos en este apartado, y en concreto a los relacionados con el modelo SOD1G93A, se plantea la necesidad de realizar más estudios que analicen la actividad del sistema UPS a lo largo de la enfermedad.

2.3 AUTOFAGIA

2.3.1 ASPECTOS GENERALES

La autofagia es el proceso de degradación de componentes intracelulares a través de lisosomas. Los lisosomas son el componente esencial de este sistema proteolítico, y se caracterizan por ser vesículas de membrana simple que contienen en su lumen una gran variedad de hidrolasas celulares que incluyen proteinasas, lipasas, glicosidasas y nucleotidasas responsables de degradar los productos de deshecho (Wong and Cuervo 2010). El principal papel de la autofagia es el de proteger a la célula de situaciones de estrés como por ejemplo el ayuno. Durante los periodos de ayuno, se degradan materiales citoplasmáticos para producir amino ácidos y ácidos grasos que serán usados para sintetizar nuevas proteínas, o serán oxidados en la mitocondria para producir energía en forma de ATP. Sin embargo, cuando se pierde el control del proceso autofágico y éste está excesivamente inducido, se puede producir la muerte celular. Este proceso se conoce como muerte programada de tipo II (Chen and Klionsky 2011).

A través de la autofagia no sólo se produce la simple eliminación de materiales, sino que además sirve como un sistema dinámico de reciclaje que produce nuevos sustratos y energía para la renovación celular y la homeostasis celular (Mizushima and Komatsu 2011). De este modo, la autofagia participa en los procesos de crecimiento celular, supervivencia, desarrollo y muerte; y por esta razón, está implicada en patologías como el cáncer, enfermedades neurodegenerativas, miopatías y enfermedades de hígado, corazón o gastrointestinales (Kroemer et al. 2010).

El proceso de la autofagia fue observado por primera vez por Keith R. Porter y su estudiante post-doctoral Thomas Ashford en 1962; sin embargo, el término de "autofagia" es debido a Christian de Duve. Fue precisamente este último quien

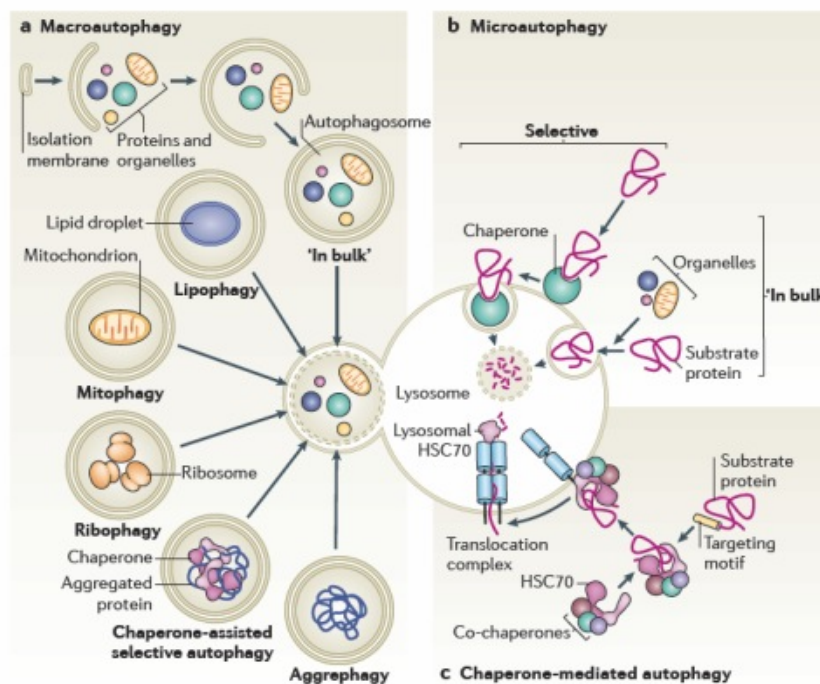
consiguió el premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1974 por el descubrimiento de los lisosomas y los peroxisomas.

2.3.2 CLASIFICACIÓN

Se diferencian 3 tipos principales de autofagia en función de cómo se presenta el material a eliminar a los lisosomas: la autofagia mediada por chaperonas (CMA, chaperone-mediated autophagy), la microautofagia y la macroautofagia o autofagia propiamente dicha (figura 1). Aunque estos procesos tienen en común la participación del lisosoma, difieren entre ellas en el modo en que se señalan o seleccionan los sustratos, cómo se regula el proceso en sí y/o las condiciones que rodean a la activación de uno y no otro.

Además, cuando se va a proceder a degradar un orgánulo celular específico, se puede hablar también de mitofagia, lipofagia, pexofagia, reticulofagia o ribofagia cuando se trata de mitocondrias, gotas de lípidos, peroxisomas, retículo endoplasmático o ribosomas (Klionsky et al. 2003).

FIGURA 1 Tipos de autofagia. Macroautofagia (a), microautofagia (b) y autofagia mediada por chaperonas (c) (Cuervo 2011).



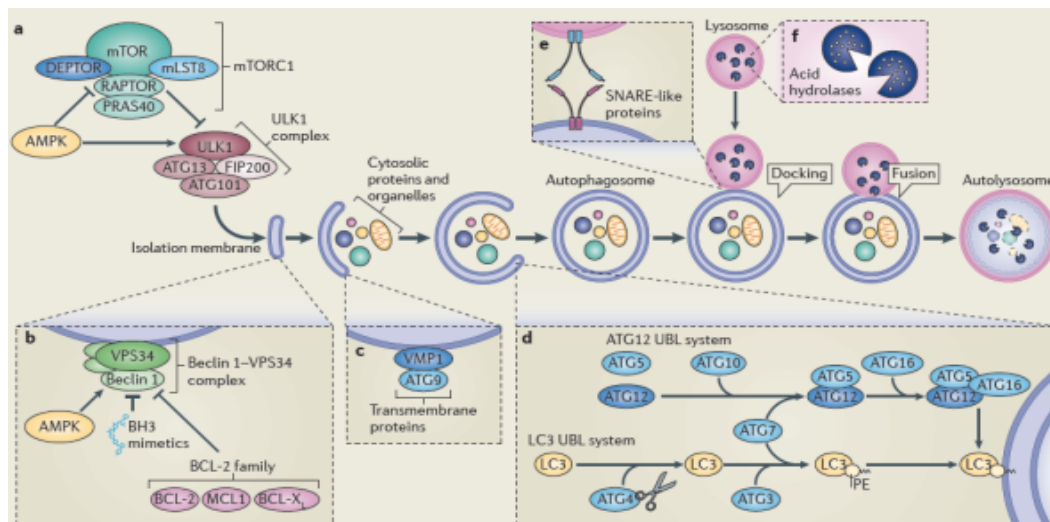
2.3.2.1 Macroautofagia

La macroautofagia se caracteriza por usar un tipo intermediario de orgánulo denominado autofagosoma. Se piensa que este es el principal tipo de autofagia que se produce en las células, y por este motivo, se le denomina simplemente con el término autofagia y es la forma más estudiada.

El proceso comienza cuando una membrana de aislamiento de nueva formación, denominada fagóforo, secuestra una pequeña porción de citoplasma que incluye materiales solubles y orgánulos, para formar el autofagosoma, y finaliza con la fusión del autofagosoma al lisosoma para degradar los materiales que contiene en su interior. Ocasionalmente, se puede producir un paso intermedio, previo a la fusión con el lisosoma, que implica la unión con el endosoma (Mizushima and Komatsu 2011).

El descubrimiento en levaduras, en la década de los 90, de una familia de aproximadamente 35 proteínas conocidas como proteínas relacionadas con la autogagia o ATG que participan en la formación de los autofagosomas, ha permitido comprender el mecanismo molecular por el cual se produce la autofagia (Mizushima and Komatsu 2011). En mamíferos se han encontrado proteínas ortólogas a las Atg de levaduras, así como factores adicionales específicos. Estas proteínas se organizan en complejos funcionales que participan en la regulación de cada uno de los pasos de la autofagia como se detalla más adelante (Wong and Cuervo 2010).

FIGURA 2 Proceso de autofagia. Iniciación (a), nucleación (b,c), elongación (d) y fusión lisosoma al autofagosoma (e). (Marino et al. 2014)



El proceso de autofagia está dividido en varias etapas bien caracterizadas como son la inducción, la nucleación, la elongación y la fusión al lisosoma (figura 2) (Chen and Klionsky 2011; Lilienbaum 2013; Marino et al. 2014).

Inducción. En mamíferos la inducción se inicia con la disociación del complejo mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) que es un regulador negativo de la autofagia y el complejo ULK1. Esta separación conlleva la activación del complejo ULK1 que está formado por la kinasa ULK1 o ULK2, Atg13, Atg101 y FIP200 (FAK family kinase-interacting protein of 200 kDa o Atg7 en levaduras).

Nucleación. Para que se inicie el proceso autofágico, el complejo formado por VSP34 y Beclin1 (también conocido como complejo PtdIns3K, phosphatidylinositol-3-OH kinase) presente en la membrana del fagoforo (membrana de aislamiento) y que se encuentra inhibido por la familia de proteínas antiapoptóticas BCL-2 entre otros componentes, tiene que activarse. Dos proteínas transmembrana, ATG9 y VAMP1 parecen ser las responsables de agrupar las proteínas y los lípidos que participarán en la construcción del autofagosoma.

Elongación. En la formación del autofagosoma participan dos sistemas UBL (ubiquitin-like) que son el relacionado con la unión de LC3 (Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3) a la fosfatidiletanolamina, y el Atg12-Atg5:Atg16.

Fusión al lisosoma o formación del autolisosoma donde se produce la descomposición del material de desecho gracias a las hidrolasas ácidas presentes en los lisosomas. La unión entre el lisosoma y el autofagosoma se realiza por medio de las proteínas SNARE (soluble N-ethylamide sensitive factor attachment protein receptor). Para que los productos resultantes de la degradación puedan liberarse al citosol es necesario la colaboración de enzimas permeasas.

Aunque en un principio la autofagia se consideró un proceso inespecífico o no selectivo, recientemente se ha visto que se puede tratar también de un proceso selectivo debido a la participación de proteínas como LC3. Si bien LC3 es una proteína esencial para la formación del autofagosoma, además es capaz de unirse a otras proteínas adaptadoras como es el caso de p62/SQSTM1 (sequestosome 1) o NRB1. En el caso concreto de la proteína p62, se une a LC3

a través de las regiones LIR (LC3-interacting region), que a su vez pueden unirse a proteínas UBA (ubiquitin-binding adaptor) los cuales permiten que se produzca la unión a sustratos ubiquitinados (Lilienbaum 2013).

2.3.2.2 Microautofagia

En este caso es el propio lisosoma quien secuestra una pequeña porción del citoplasma por la invaginación, protrusión o septación de su membrana hacia el interior (Mizushima and Komatsu 2011).

Este proceso ha sido ampliamente caracterizado en levaduras, donde se han localizado un grupo de genes que contribuyen a la formación de las proyecciones de las membranas desde la superficie de la vacuola. Sin embargo, la ausencia de genes homólogos a los de levaduras en mamíferos, ha dificultado enormemente el conocimiento de este proceso (Wong and Cuervo 2010).

2.3.2.3 Autofagia mediada por chaperonas (CMA)

En este tipo de autofagia el sustrato a degradar migra directamente a la membrana del lisosoma tras unirse a la chaperona Hsc70 y co-chaperonas como BAG1, Hip, Hop y HSP40/DNAJB1 que reconocen específicamente la secuencia consenso KFERQ (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln) (Musaro 2010; Orenstein and Cuervo 2010; Lilienbaum 2013). La unión de la proteína al lisosoma se produce a través del receptor LAMP-2A, de la familia de las proteínas LAMP (lysosomal-associated membrane proteins); siendo esta unión crucial para el proceso. Finalmente, se requiere que la proteína se despliegue totalmente para que se internalice en el lisosoma a través de un complejo de translocación (Mizushima and Komatsu 2011).

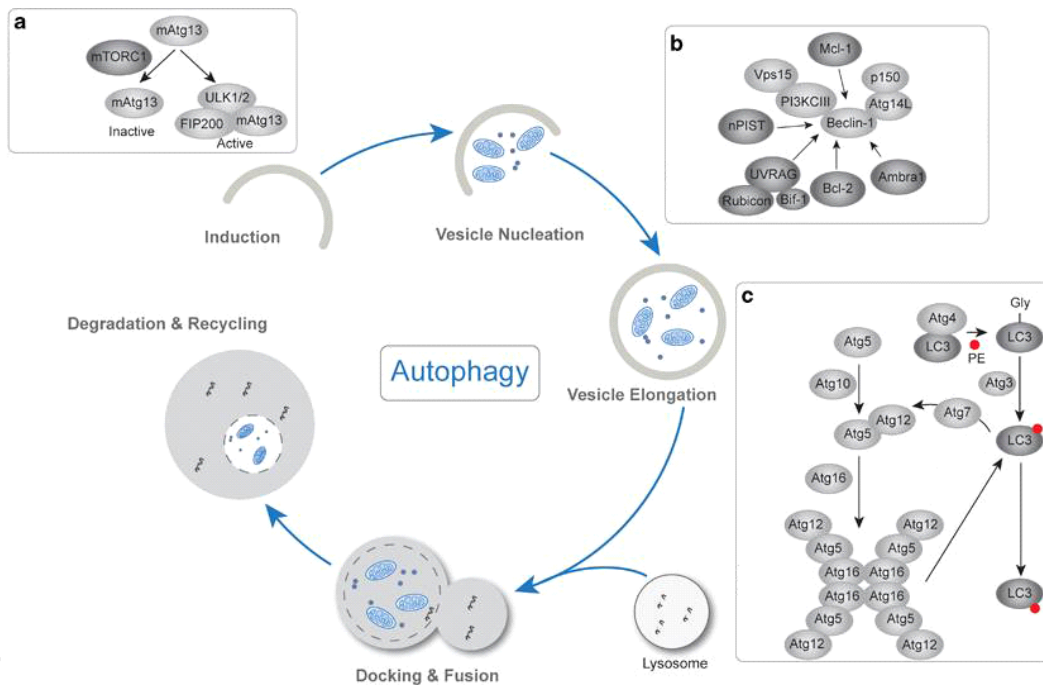
Todas las células presentan una CMA basal, pero la mayor activación de este proceso se produce como respuesta a situaciones de estrés.

2.3.2 REGULACION DE LA AUTOFAGIA

Al igual que ocurre con todas las vías de degradación, la regulación juega un papel clave a la hora de activar el proceso autofágico. Son varias las moléculas

y cascadas de señalización que modulan la autofagia en respuesta a numerosas señales celulares y ambientales, de los cuales destacan mTORC1, el complejo PtdIns3K y los sistemas de conjugación UBL (figura 3).

FIGURA 3 Regulación de la autofagia a través de mTORC1 (a), del complejo PtdIns3K (b) y los sistemas de conjugación UBL (c) (Liu 2013).

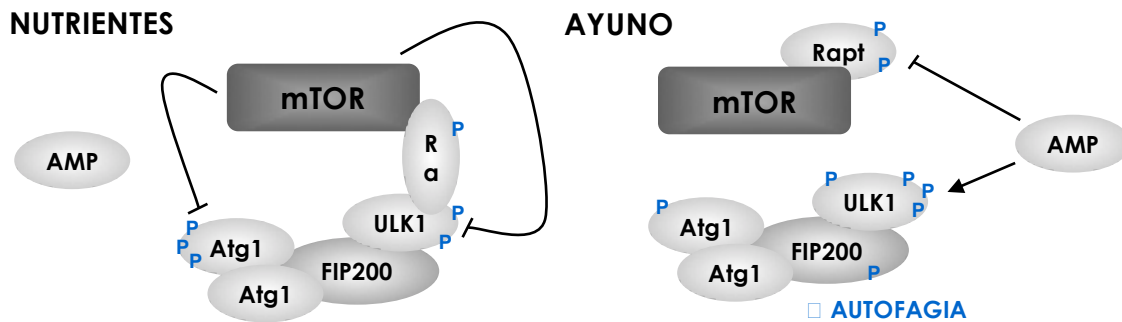


Uno de los reguladores de la autofagia mejor caracterizado es mTORC1 que actúa a nivel de la inducción (figura 3_a). Esta kinasa regula negativamente el proceso al inhibir la actividad del complejo ULK1 por una fosforilación directa del mismo. La actividad de mTORC1 puede estar estimulada en situaciones de abundancia de nutrientes, o inhibida cuando los amino ácidos o el ATP escasean (ayuno) (Boya et al. 2013). Aunque en un principio las únicas modificaciones postransduccionales que se consideraban eran la fosforilación del complejo ULK1 y las reacciones como ubiquitinación, procesos centrales durante la formación de los autofagosomas por medio de la generación de los conjugados Atg12-Atg5 y LC3- fosfatidiletanolamina, hoy se sabe que se producen un amplio rango de modificaciones como la fosforilación, la ubiquitinación y la acetilación (McEwan and Dikic 2011).

Además, ULK1 esta fosforilado directamente por la proteína AMPK (AMP-activated protein kinase) como respuesta a las situaciones donde se produce

una restricción de energía. Por lo que AMPK desencadena el proceso de autofagia regulando positivamente el complejo ULK1 e inhibiendo mTOR (figura 4).

FIGURA 4 Regulación de la autofagia a través de mTOR.



Otro de los grandes puntos de regulación (figura 3_b) es el complejo PtdIns3K. Este complejo es esencial para que se produzca la nucleación de la vesícula. En mamíferos se han descrito 3 clases de complejos (clase I, II y III), siendo el complejo de clase III el que participa en el proceso de la autofagia, y el que cuenta entre sus subunidades con Beclin1 o Vsp34. La unión de proteínas antiapoptóticas de la familia de Bcl2 o de Rubicon (RUN domain containing protein) regula de forma negativa la autofagia, mientras que con la unión de proteínas como AMBRA1 (activating molecule in beclin1-regulated autophagy) o Atg14 la regulación es positiva (Chen and Klionsky 2011; Mizushima and Komatsu 2011).

Otro punto de regulación importante se produce a nivel de la elongación de la membrana con los sistemas de conjugación UBL ya sea a través de Atg12 o de LC3.

El primer sistema de conjugación implica a las proteínas Atg12 y Atg5 y está relacionado con la elongación y el cierre del autofagosoma, mientras que el segundo sistema está relacionado con la proteína LC3 y podría incluso determinar el tamaño del autofagosoma (Xie et al. 2008).

En estos dos sistemas intervienen varias proteínas Atg. La activación de Atg12 se produce por Atg7 que actúa a modo de enzima E1 para ser conjugada a través de Atg10 que funciona a modo de enzima E2 (Geng and Klionsky 2008).

Finalmente se produce la unión de Atg12-Atg5 a Atg16L en una unión no covalente para constituir un complejo con actividad enzimática E3 (figura 3_c). En el segundo sistema de conjugación, Atg4 que es una cistina proteasa rompe a LC3 en el extremo C terminal. A continuación se produce la activación de LC3 por Atg7 (enzima E1) que es transferida a Atg3 (enzima E2), para finalmente unirse al grupo fosfatidiletanolamina por el complejo formado por Atg12-Atg5:Atg16L (Hanada et al. 2007; Fujita et al. 2008).

Además, Atg4 es necesaria para la maduración de LC3 y para soltar el PE de LC3 en la membrana del autofagosoma, con lo cual actúa como una enzima descojugante y permite controlar los niveles de LC3 activa.

Los datos sugieren que entre ambos sistemas de conjugación, LC3-PE y Atg12-Atg5, podrían existir puntos en común como serían la enzima Atg7 que activa tanto Atg12 como LC3 y el complejo Atg5-Atg12-Atg16L necesario para la unión de PE a LC3 y la formación del autofagosoma (Geng and Klionsky 2008).

2.3.3 AUTOFAGIA Y ELA

Una gran cantidad de evidencias indican que la autofagia es un mecanismo relacionado más con la supervivencia celular que con la muerte, y en el contexto de las enfermedades neurodegenerativas, parece existir el consenso de que la inducción de la autofagia juega un papel neuroprotector, mientras que un proceso defectuoso de la misma promueve la patología (Hochfeld et al. 2013). De este modo, una disminución en el flujo autofágico contribuye a la progresión de la enfermedad al promover la acumulación de agregados proteicos, la disfunción mitocondrial y el aumento de la susceptibilidad a la muerte celular (Hochfeld et al. 2013).

La degeneración y muerte de las motoneuronas en la ELA está caracterizada, entre otros acontecimientos, por la agregación de proteínas. El estudio de estos agregados en formas de ELAF y ELAE ha permitido identificar a las proteínas SOD1 y TDP43 como las principales constituyentes de los mismos. En un principio se postuló que las alteraciones del sistema UPS producían la enfermedad de la ELA asociada a agregados proteicos (Kabashi et al. 2004; Koyama et al. 2006; Cheroni et al. 2009), pero estudios recientes indican que la autofagia también

juega un papel relevante en esta enfermedad. Es más, el retraso del progreso neurodegenerativo podría deberse a la activación de la autofagia.

La mayor parte de los trabajos que se han realizado sobre el proceso de la autofagia en el modelo murino SOD1G93A están relacionados con las motoneuronas y más concretamente con las de la medula espinal.

2.3.3.1 Motoneuronas SOD1G93A y autofagia

Se han realizado abundantes trabajos con modelos de motoneurona que indican que tanto la presencia de abundantes vacuolas autofágicas como el aumento de proteínas relacionadas con la autofagia son debidos a un defecto en la progresión de la misma (Fornai et al. 2008a; Li et al. 2008a; Bendotti et al. 2012). El aumento de proteínas autofágicas como LC3-II se produce como consecuencia de una falta de la progresión de la autofagia y la falta de un mecanismo compensatorio, lo que promueve la acumulación de proteínas mal plegadas y/u orgánulos alterados. Este hecho está avalado por el trabajo realizado por Venkatachalam et al. 2008 (Venkatachalam et al. 2008) que demostró que un proceso autofagico defectuoso en motoneuronas enfermas va acompañado por una acumulación de autofagosomas que se relaciona con el comienzo de la enfermedad y los síntomas clínico motores.

Además, esta alteración de la autofagia está presente ya desde los estadios presintomáticos de la enfermedad, como demuestra que el número de vacuolas autofágicas LC3 positivas esté aumentado en las motoneuronas de la medula espinal de ratones transgénicos (Li et al. 2008a). Sin embargo, no se sabe si este incremento es debido a un aumento de la autofagia o a un fallo del flujo autofágico. Además, aunque la presencia de autofagosomas está relacionada con la muerte neuronal, se desconoce si la autofagia participa activamente en el proceso de la muerte de la motoneurona en la ELA.

La autofagia disminuye la toxicidad inducida por las proteínas mSOD1 y la activación de la misma disminuye los niveles de proteína SOD1 en las formas de ELAF (Kabuta et al. 2006).

Se ha investigado el efecto que producen determinados fármacos sobre el proceso autofágico en orden a incrementar o restaurar el flujo autofágico que se encuentra alterado en las motoneuronas, y encontrar un posible tratamiento

que mejore la patología de la ELA. De los fármacos empleados destaca el litio, la rapamicina, la progesterona y últimamente la trehalosa.

En cultivos primarios de motoneuronas de ratones SOD1G93A, la inducción de la autofagia por el tratamiento con litio y rapamicina, elimina las proteínas SOD1 al igual que las ubiquitinas y α -sinucleinas, las cuales son características de determinadas formas de ELAF Y ELAE. Ambos fármacos producen un aumento de la expresión de marcadores autofágicos y la recuperación de la patología celular. El tratamiento con litio es capaz de inducir la autofagia para eliminar estas proteínas y así poder rescatar a las motoneuronas de la excitotoxicidad en ratones WT y transgénicos (Fornai et al. 2008a; Fornai et al. 2008b; Caldero et al. 2010). Además, este compuesto es capaz de producir un retraso en el comienzo de la enfermedad y aumentar la supervivencia de los ratones transgénicos, activar la autofagia, aumentar las mitocondrias en las motoneuronas y suprimir la astrogliosis reactiva (Basso et al. 2006).

Por el contrario, el tratamiento con rapamicina, que es un fármaco que aumenta la autofagia por inhibición de mTOR, acelera la degeneración de la motoneurona, además de disminuir la supervivencia en los ratones enfermos, aumentar los niveles de Bax y aumentar la activación de caspasa 3. Este resultado parece indicar que la degeneración selectiva de las motoneuronas está asociada con una discapacidad del proceso autofágico (Zhang et al. 2011).

El tratamiento con progesterona además de aumentar el flujo de la autofagia, reduce los niveles de la proteína mSOD1 y la muerte de la motoneurona, retrasa la disfunción motora y aumenta la vida de los animales tratados. Este tratamiento activa la autofagia y además, presenta un efecto neuroprotector en los ratones SOD1G93A de ELA (Kim et al. 2013).

En el caso de la trehalosa, su administración retrasa el comienzo de la enfermedad, prolonga la supervivencia y reduce la muerte de las motoneuronas en la medula de los ratones SOD1G93A. También disminuye la agregación de SOD1 y p62, reduce la acumulación de ubiquitinas y mejora el flujo autofágico. Además puede reducir la denervación del músculo esquelético, proteger la mitocondria e inhibir las vías proapoptóticas (Zhang et al. 2014).

La publicación de un reciente estudio ha permitido conocer que la alteración en el proceso de la autofagia está vinculada a la degeneración de las motoneuronas del tronco cerebral al igual que ocurre en las de la medula espinal. Y además se acompaña de la acumulación de SOD1 en astrocitos, gliosis y estrés oxidativo como en la medula espinal (An et al. 2014).

Todos estos datos parecen indicar que la autofagia ejerce un papel neuroprotector en las motoneuronas de la medula espinal, pero no se ha realizado ningún estudio completo del proceso a lo largo de la enfermedad, desde los estadios presintomáticos hasta el estadio terminal.

2.3.3.2 Músculo y autofagia

Como se ha indicado previamente, el proceso de eliminación de proteínas SOD1 mal plegadas es más eficiente en las células musculares C2C12 que en la línea celular de motoneuronas NSC34. Esta limpieza en el músculo se correlaciona con una mayor eficiencia del proteasoma junto con la activación del proteasoma (Onesto et al. 2011). Los resultados de este trabajo también parecen indicar que las células musculares son más resistentes a la acumulación de la proteína mSOD1 mal plegada.

El mismo grupo de investigadores ha presentado recientemente un trabajo realizado con tejido muscular procedente de ratones SOD1G93A y ha corroborado los resultados que anteriormente habían obtenido con los estudios *in vitro*. En el músculo la autofagia inducida por las formas mutadas de SOD1 es mayor que en tejido procedente de la médula espinal, pero todavía se desconoce si la toxicidad de mSOD1 está relacionada con una actividad de la autofagia aberrante. Además, si mSOD1 ejerce un efecto tóxico en el músculo, éste podría no estar mediado por la acumulación de proteínas mal plegadas (Crippa et al. 2013).

Los trabajos que se han realizado para conocer la situación del proceso autofágico en el tejido muscular con presencia de agregados proteicos de SOD1 son muy escasos, lo que pone de manifiesto la necesidad de realizar estudios que describan con mayor profundidad dicho proceso a lo largo de la enfermedad.

2.4 APOPTOSIS

2.4.1 ASPECTOS GENERALES DE LA APOPTOSIS

La apoptosis es un tipo de muerte celular programa caracterizada por una serie de cambios morfológicos que incluyen la condensación (pyknosis) y fragmentación (karyorrhexis) del núcleo, así como la formación de cuerpos apoptóticos. Además está acompañado por una serie de cambios bioquímicos característicos como son la permeabilización de la membrana mitocondrial exterior (MOMP, mitochondrial outer membrane permeabilization), la activación de caspasas efectoras (caspasa 3, 6 y 7) y la activación de hidrolasas catabólicas que degradan la mayoría de las macromoléculas celulares, incluyendo el DNA (Marino et al. 2014).

En general, existen dos tipos de apoptosis: la intrínseca que se induce intracelularmente y la extrínseca, cuya activación es extracelular (figura 1). Dentro de las formas extrínsecas se han descrito dos grupos, la extrínseca mediada por receptores de dependencia y la mediada por receptores de muerte. Mientras que en el caso de la apoptosis intrínseca, ésta puede ser dependiente o independiente de caspasas (Galluzzi et al. 2012b).

2.4.1.1 Apoptosis extrínseca

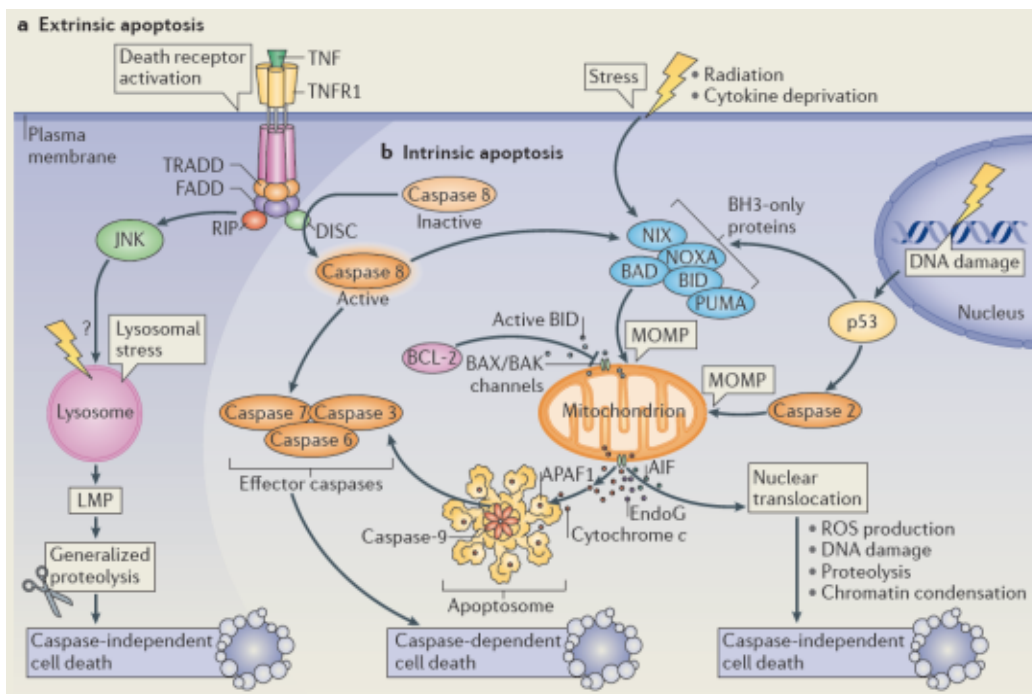
El término de apoptosis extrínseca hace referencia a la muerte celular inducida por señales extracelulares de estrés cuya sensación y propagación se lleva a cabo por receptores transmembrana específicos. Se trata de una apoptosis dependiente de caspasas y por ello, puede ser inhibida por sustancias pan-caspasas.

La apoptosis extrínseca se produce a través de tres vías principales (Galluzzi et al. 2012b):

- A través de receptores de muerte que activan la caspasa 8, que a su vez conduce a la cascada de la caspasa 3, que es una caspasa efectora de la muerte celular por apoptosis.
- A través de receptores de muerte que activan la caspasa 8 que promueve la liberación de BID, la permeabilización de la membrana exterior de la mitocondria y la activación de caspasa 9. Esta última caspasa forma parte del apoptosoma que activa a las caspasas efectoras (caspasa 3,6 y 7).
- O bien, inducida por la falta de ligando a través de receptores de dependencia que conducen a la activación de caspasa 9 y de las caspasas efectoras.

La apoptosis extrínseca puede ser iniciada por la unión de ligandos letales como FAS/CD95, el receptor de TNFR1 (tumour necrosis factor receptor 1) o el receptor TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand). Como resultado de esta unión, se produce la movilización de proteínas como FADD (FAS associated death domain), TRADD (TNFR1-associated death domain) y la caspasa 8.

FIGURA 1 Tipos de apoptosis (Marino et al. 2014)



La activación de la caspasa 8 puede propagar la muerte celular a través de 3 vías: por la activación proteolítica directa de las caspasas efectoras, por la

proteólisis de BID (BH3-interacting domain death agonist) que provoca la migración de la proteína truncada BID a la mitocondria y la consecuente permeabilización de la membrana exterior o por la activación de la kinasa RIP (Galluzzi et al. 2012b; Marino et al. 2014).

2.4.1.2 Apoptosis intrínseca

La apoptosis intrínseca está caracterizada por un hecho fundamental que es permeabilización de la membrana mitocondrial exterior (MOMP); y por ello, va siempre asociado a una disipación del potencial de la membrana mitocondrial generalizada e irreversible, la liberación de proteínas del espacio mitocondrial intermembranoso al citosol y la inhibición de la cadena respiratoria. Se produce como respuesta a una situación de estrés intracelular como puede ser el daño al DNA o una sobrecarga de calcio citosólico, que desencadena una serie de señales que favorecen la supervivencia o la muerte celular.

En el caso de la apoptosis intrínseca independiente de caspasas, como consecuencia de MOMP, se liberan las proteínas AIF o EndoG que se traslocan al núcleo y promueven la fragmentación del DNA. Mientras que en el caso de la dependiente de caspasas, la liberación de citocromo c contribuye a la formación del apoptosoma que se une a la caspasa 9 y activa la cascada de la caspasas efectoras (Zhang et al. 2011; Galluzzi et al. 2012b; Marino et al. 2014).

2.4.2 APOPTOSIS EN LA ELA

La implicación de la mitocondria en la enfermedad de la ELA está avalada por los hallazgos obtenidos en los numerosos trabajos llevados a cabo tanto en pacientes como en modelos animales.

Las primeras investigaciones realizadas en tejidos procedentes de necropsias de pacientes ya mostraban alteraciones morfológicas de las mitocondrias en las neuronas de la médula espinal y en el músculo esquelético (Hirano et al. 1984). En relación con los modelos animales, en la medula espinal de los ratones SOD1 se han detectado defectos en la capacidad de tamponamiento del calcio (Kawamata and Manfredi 2010) y en la actividad de la cadena transportadora de electrones en los estadios presintomáticos de la enfermedad (Jung et al.

2002). Además en los ratones SOD1G93A se han encontrado mitocondrias con crestas dilatadas y desorganizadas en los axones y las dendritas de motoneuronas en el comienzo de la enfermedad (Kong and Xu 1998). En estos mismos ratones, este comienzo del trastorno está precedido por un aumento de la degeneración de las mitocondrias con casi ausencia de muerte de las motoneuronas, que continua progresando durante la fase sintomática junto con la aparición de vacuolas en el interior de las mitocondrias (Higgins et al. 2003). El hecho de que estas anomalías morfológicas aparezcan en ratones antes de los síntomas y que además se produzca la degeneración de las motoneuronas, sugiere que el deterioro mitocondrial desempeña un papel clave en la iniciación de degeneración de neuronas motoras en la ELA.

La presencia de agregados insolubles de mSOD1 en la membrana exterior de la mitocondria, plantea la posibilidad de que la proteína mSOD1 afecte directamente a la función mitocondrial provocando en última instancia la muerte celular. De hecho, las mitocondrias aisladas expuestas *in vitro* a mSOD1 purificada mostraron una mayor susceptibilidad al estrés oxidativo y al daño estructural, lo que finalmente causó la liberación del citocromo c (Pedrini et al. 2010; Pickles et al. 2013). Además, la proteína mSOD1 puede unirse de forma aberrante a Bcl-2 en la membrana externa mitocondrial y desencadenar la toxicidad mediada por esta proteína (Pedrini et al. 2010; Tan et al. 2013). Aunque las mitocondrias alteradas por la ELA pueden desencadenar el proceso apoptótico y la muerte celular a través de la liberación de citocromo c (Naniche et al. 2011), se desconoce todavía si la apoptosis iniciada por las mitocondrias tiene un papel determinante en la neurodegeneración. En ratones SOD1G93A a los que se les ha bloqueado la proteína pro-apoptótica Bax, el comienzo y la progresión de la enfermedad se retrasa y se previene la muerte de las motoneuronas, aunque la degeneración de las mitocondrias se sigue produciendo. Estos datos sugieren que la apoptosis mediada por mitocondrias en las motoneuronas podría ser un efecto secundario en la neurodegeneración (Fischer et al. 2004; Fischer and Glass 2007). Por otro lado es interesante destacar que cuando en el mismo modelo murino de ELA se bloquean Bax y Bak que son proteínas pro-apoptóticas de la familia de Bcl2, se produce un aumento de la supervivencia de los ratones (Reyes et al. 2010). Al tratarse de dos proteínas que participan en la formación de poros en la membrana externa de la mitocondria

a través de los cuales se libera el citocromo c (Korsmeyer et al. 2000), estos resultados ponen de manifiesto la importancia de la permeabilización de la membrana mitocondrial en la patogénesis de la ELA.

En las terminaciones nerviosas las mitocondrias son muy abundantes y se encargan de proporcionar energía y regular los niveles de calcio. Por esta razón es necesario que se coordine la actividad sináptica, el transporte y la distribución mitocondrial y la generación de ATP. Sin embargo, en ratones mSOD1 el transporte axonal es lento debido a la rotura de la red de neurofilamentos (Zhang et al. 1997; Ligon et al. 2005) y la acumulación de proteínas insolubles (Tateno et al. 2009). Este transporte deficiente que impide el reemplazo de las mitocondrias dañadas en las terminales neuromusculares puede causar la enfermedad a través del denominado "dying back", previamente señalado.

Si bien son numerosos los trabajos que han estudiado la apoptosis en las motoneuronas, el estudio de este tipo de muerte celular asociado a la atrofia muscular en el contexto de la ELA es más bien escaso. En ratones SOD1G93A, la expresión de mSOD1 puede causar primero la atrofia del músculo para continuar produciendo la alteración de la unión neuromuscular, la degeneración axonal retrógrada y finalmente terminar con la muerte de la motoneurona. Este patrón retrógrado y progresivo sugiere la posibilidad de que determinadas anormalidades musculares precedan a la muerte de la motoneurona y no al revés. Los resultados obtenidos por este grupo indican que la atrofia muscular asociada a la expresión de SOD1 es independiente de la activación de las caspasas, mientras que en los músculos paralizados se produce la muerte por apoptosis mediada por caspasas (Dobrowolny et al. 2011).

2.5 RELACION ENTRE PROTEASOMA, AUTOFAGIA Y APOPTOSIS

2.5.1 AUTOFAGIA Y PROTEASOMA

La necesidad de mantener la homeostasis energética y el equilibrio proteico (proteostasis) requiere que ambos sistemas de degradación estén controlados y coordinados durante toda la vida celular. La contribución relativa de cada sistema es diferente en función del tipo celular. En general, se puede decir que las proteínas de vida corta son degradadas preferiblemente por el proteasoma, mientras que las de vida larga son sustratos preferidos por la autofagia (Clague and Urbe 2010).

Aunque durante mucho tiempo se ha considerado que el sistema UPS y la autofagia eran independientes entre sí, se ha demostrado que existe una conexión entre ambos. En condiciones normales, ambos procesos están sintonizados para regular procesos celulares relevantes que requieren modificaciones en las proteínas. Esta regulación del catabolismo de las proteínas es vital para proteger a la célula de los efectos tóxicos de las formas mutadas y/o mal plegadas (Li et al. 2008b).

Por tanto, los trabajos que demuestran la conexión existente entre el proteasoma y la autofagia son numerosos. Así, Zeng et al. (2009) sugieren que la autofagia compensa la labor del UPS cuando este no es capaz de desarrollar su función correctamente, y viceversa. Además, la inhibición de UPS activa la degradación de proteínas por autofagia (Zheng et al. 2009; Crippa et al. 2010), mientras que cuando se inhibe la autofagia se produce la acumulación de proteínas ubiquitinadas en el citoplasma (Hara et al. 2006).

Por otro lado, se han identificado proteínas comunes para los 2 sistemas, como es el caso de la chaperona Cdc48 (también denominada p97 o VCP) presente en algunas formas de ELAF (Johnson et al. 2010).

También son numerosos los trabajos que han demostrado en neuronas de pacientes de ELAF y ELAE, que cuando se producen alteraciones en distintos

pasos de estos complejos sistemas de degradación, tiene lugar una acumulación de proteínas aberrantes.

La comunicación existente entre UPS y autofagia puede llevarse a distintos niveles, a nivel del tipo de proteína a degradar, de las proteínas que marcan los productos aberrantes como ubiquitinas o co-chaperonas o de las moléculas comunes adaptadoras como p62 o reguladoras como factores de transcripción o LC3.

2.5.1.1 Tipo de proteína a degradar

El primer nivel de comunicación entre el UPS y la autofagia se encuentra en el tipo de proteína que va a ser degradada. Las proteínas contienen en su estructura elementos que determinarán su destino, como son:

- La estabilidad y la vida media de las mismas en función de la presencia de secuencias “degron” o zonas hidrofóbicas. Las “degron” son secuencias específicas de amino ácidos que marcan el lugar de inicio de la degradación.
- La estructura secundaria que determina su inestabilidad o la exposición de las zonas hidrofóbicas.
- La solubilidad, ya que las proteínas solubles prefieren ser degradadas por el proteasoma, mientras que los agregados proteicos solo pueden ser degradados por la autofagia (Ding and Yin 2008).

La mayoría de las proteínas solubles prefieren ser degradadas por el proteasoma, y por el proceso de autofagia cuando la capacidad del proteasoma se ha excedido. Sin embargo, los agregados solo pueden ser eliminados por la autofagia (Pankiv et al. 2007).

2.5.1.2 Señalización de las proteínas

En función de cómo se produzca el marcaje de las proteínas a degradar, bien sea por ubiquitinas o proteínas como ubiquitinas, el destino de las mismas variará. Este rumbo dependerá de la estructura y la polimerización realizada por las ubiquitinas.

Sin embargo, previo al proceso de ubiquitinación, las proteínas aberrantes son detectadas por el sistema de chaperonas/co-chaperonas (Tyedmers et al. 2010). Este sistema de degradación se encarga de las proteínas recién

sintetizadas, de las desnaturalizadas por situaciones de estrés o de las que presentan regiones con niveles muy bajos de estructuración. Dentro de las co-chaperonas que median en los procesos UPS y de autofagia, destacan CHIP y BAG.

Como consecuencia de este primer paso de identificación por chaperonas o co-chaperonas, las proteínas a degradar se unirán a ubiquitinas.

2.5.1.3 Moléculas comunes adaptadoras

El siguiente nivel de comunicación se produce después de la ubiquitinación a través de las moléculas adaptadoras como son p62, NRB1, UBD (proteins bearing ubiquitin binding domains) o UBA (ubiquitin-associated domains). Estos adaptadores se encargan de llevar las proteínas al proteasoma o de conectar con sustratos autofágicos.

La proteína p62/SQSTM1 es una molécula adaptadora de unión a proteínas ubiquitinadas a través de dominios UBA por un lado y de unión directa a LC3 y otros homólogos de Atg8 a través de los motivos LIR (regiones de interacción con LC3) por otro (Pankiv et al. 2007). Además puede interactuar con subunidades intrínsecas del proteasoma a través de dominios UBL (ubiquitin like) para transportar sustratos al proteasoma (Komatsu and Ichimura 2010).

Mientras que los inhibidores del proteasoma inducen autofagia como respuesta compensatoria (Ding et al. 2007), la inactivación genética de genes esenciales para el proceso autofágico produce la acumulación y agregación de proteínas ubiquitinadas (Hara et al. 2006; Komatsu et al. 2006). Sin embargo cuando se producen largos periodos de inhibición de la autofagia, la eliminación de proteínas de vida corta específicas del proteasoma se ralentiza por los niveles elevados de p62 (Korolchuk et al. 2010), es decir, cuando se inhibe la autofagia no se induce el UPS como mecanismo compensatorio.

2.5.1.4 Moléculas comunes reguladoras

Las moléculas reguladoras pueden activar o inhibir un sistema y por ello, pueden ser degradadas por el otro; dentro de ellas se encuentran varias quinasas y los factores de transcripción como p53.

Este es el caso de LC3 que participa en la formación de los autofagosomas y en la selección de los sustratos a eliminar, y que puede ser degradada por el proteasoma sin necesidad de ser ubiquitinada (Gao et al. 2010); pero este proceso todavía no es bien conocido. Además se ha descrito que las subunidades del proteasoma también pueden ser eliminadas a través del sistema de autofagia (Kristensen et al. 2008).

2.5.1.5 Mecanismos integrativos

Un último nivel de control son los programas generales celulares que coordinan la actividad de distintos genes involucrados en los sistemas de degradación a través de la actividad de quinasas y factores de transcripción. Dentro de estos mecanismos, se encuentran los programas de respuesta al estrés del ER, el programa de atrofia en músculo y los programas de detección de los niveles de energía celular (este último más discutido).

2.5.1.5.1 Vía del estrés del ER

Uno de los principales elementos que coordina la actividad del UPS y la autofagia es el ER. El ER es el lugar donde se producen las modificaciones post-trasduccionales de las proteínas como son el plegamiento, la oligomerización, la glicosilación y la formación de puentes disulfuro. El estrés del ER puede estar causado por una acumulación de proteínas prematuras o mal plegadas en el lumen y el citosol del ER (Schroder and Kaufman 2005).

En las células eucariotas el principal sistema de eliminación de proteínas procedentes del ER es el UPS, y el mecanismo de respuesta frente a las situaciones de estrés del ER se conoce como UPR. En las células de mamíferos, el sistema UPR está mediado por 3 vías; PERK (proteín kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase), ATF6 e IRE1. Como consecuencia de su inducción, la síntesis global de proteínas está disminuida, mientras que la de chaperonas del ER y de proteínas relacionadas con los mecanismos de degradación está aumentada. Sin embargo en situaciones de estrés, UPR puede también activar la autofagia a través de la vía IRE1 necesaria para la conjugación lipídica de LC3 (Ogata et al. 2006), de PERK al mediar la conversión de LC3 (Kuroku et al. 2007) o de ATF4 que estimula la expresión de los genes de Atg5, Atg7 y LC3.

2.5.1.5.2 Factor de transcripción FoxO

En células musculares atrofiadas, el factor de transcripción FoxO3 activa la degradación de proteínas a través de ambos sistemas y su activación es esencial (Lynch-Day and Klionsky 2010). La activación de FoxO3 causa una atrofia dramática en el músculo y en miotubos en cultivo debido a la transcripción de atrogenes como la atrogina-1 que es una ligasa ubiquitina que interviene en la degradación proteasomal de proteínas (Sandri et al. 2004). Además, FoxO3 aumenta la transcripción de determinados genes autofágicos como son LC3, Beclin1, ULK2, Bnip3 o ATG12. Este factor de transcripción constituye en las células musculares un importante punto de control que coordina ambos procesos degradativos (Zhao et al. 2008).

2.5.1.5.3 Niveles de energía celular disponible

Los niveles de energía celular disponible, es decir, de ATP, pueden constituir otro punto de comunicación entre el proteasoma y la autofagia.

La corrección del plegamiento de las proteínas dañadas por chaperonas y co-chaperonas, el ensamblaje del proteasoma, la activación de ubiquitinas por la enzima E1 y la señalización de proteínas tiene un coste energético. Cuando los niveles de ATP son bajos, estos procesos se ralentizan. Sin embargo, existen vías alternativas que no consumen ATP como la dependiente de la subunidad 19S, o con un consumo muy bajo como se produce en situaciones de estrés oxidativo. Por otro lado, los bajos niveles de ATP promueven la activación de la autofagia. La activación de la autofagia junto con la activación de procesos catabólicos podría contribuir a la reposición de los niveles celulares de ATP.

2.5.2 AUTOFAGIA Y APOPTOSIS

La relación funcional entre los procesos de autofagia y apoptosis es compleja en el sentido de que la autofagia supone una adaptación al estrés que impide la muerte celular (y de hecho suprime la apoptosis); pero en determinadas situaciones celulares, la autofagia constituye un mecanismo alternativo a la muerte celular por apoptosis que se conoce como muerte celular tipo II o muerte autofágica (Baehrecke 2005).

La autofagia y la apoptosis son dos procesos que pueden ocurrir en una misma célula secuencialmente, siendo habitual que la autofagia preceda a la apoptosis (Maiuri et al. 2007). Cuando los niveles de estrés celular son tolerables para la vida celular, se activa la respuesta autofágica como un mecanismo de reparación para restablecer las condiciones fisiológicas; pero cuando la intensidad o la duración del estrés alcanzan umbrales mortales, los programas apoptóticos y no-apoptóticos letales se activan.

En general se puede considerar que la autofagia bloquea la inducción de la apoptosis, mientras que la apoptosis asociada a la activación de caspasas inactiva el proceso autofágico. Pero en particular, las circunstancias o las proteínas esenciales que rodean a la autofagia pueden promover la muerte celular, bien por el catabolismo de partes indispensables para la vida celular o facilitando la activación de la apoptosis o la necrosis (Galluzzi et al. 2009).

Existen diversas señales que pueden provocar la activación tanto de la autofagia como de la apoptosis; pero, como es lógico, el proceso de la autofagia parece manifestarse antes de que la apoptosis elimine la célula. El hecho de que determinadas vías de transducción de señales, que se originaron por el estrés celular intrínseco, regulen tanto la autofagia como la apoptosis podría explicar la activación secuencial de ambos procesos.

Dentro de las señales que inducen ambos procesos y por tanto, pueden participar en su regulación, destacan entre otros la proteína p53, las proteínas con un único dominio BH3, algunas serina/treonina quinasas y determinados oncogenes.

A continuación se incluye una tabla con una serie de proteínas que pueden desempeñar participar en el proceso de la autofagia y de la apoptosis.

TABLA 1 Proteínas con doble función en la autofagia y la apoptosis (Mukhopadhyay et al. 2014).

| PROTEINA | FUNCION EN AUTOFAGIA | FUNCION EN APOPTOSIS |
|---------------------------------|--|--|
| PROTEINAS AUTOFAGICAS | | |
| mTOR | Inactiva proteínas involucradas en la iniciación | Regula apoptosis |
| Beclin1 | Nucleación autofagosoma | Fragmento C induce la apoptosis mitocondrial |
| UVRAG | Aumenta la interacción Vps34-Beclin1 | Anti-apoptótico al inhibir la traslocación de Bax del citosol a la mitocondria |
| AMBRA | Aumenta la interacción Vps34-Beclin1 | Regula la apoptosis mitocondrial sujeto a caspasas y calpaínas |
| Atg3 | Unión a Atg 12 | Regula la muerte celular mitocondrial |
| Atg5 | Unión a Atg12 y elongación del autofagosoma | Interacciona con FADD para inhibir la apoptosis, por fragmento N induce apoptosis mitocondrial |
| Atg12 | elongación del autofagosoma | Estimula apoptosis mitocondrial inactivando Bcl-2 y MCL1 |
| Atg4D | Procesamiento LC3 | Induce apoptosis |
| p62 | Unión a LC3 y promueve la degradación de agregados proteicos poliubiquitinados | Procesamiento y activación de caspasa 8 |
| PROTEINA | FUNCION EN AUTOFAGIA | FUNCION EN APOPTOSIS |
| PROTEINAS APOPTICAS | | |
| Bcl-2, Bcl-X_L | Interacciona con Beclin1 e inhibe la autofagia | Anti-apoptótico |
| Bad, Bak, BNIP3, Nix | Pro-autofágico y rompe la interacción de beclin1/bcl-2 | Pro-apoptótico |
| Bax, PUMA | Pro-autofágico | Pro-apoptótico |
| p53 | Inhibe por p53 citoplasmático e induce por el nuclear a través de DRAM | Pro-apoptótico |
| Noxa | Induce autofagia por romper la interacción de MCL1/beclin1 | Pro-apoptótico |
| Bim | Secuestra Beclin1, inhibe autofagia | Pro-apoptótico |
| XIAP | Inhibe por señal Mdm2-p53 | Inhibe caspasa 3 y 7 |
| cFLIP | Previene interacción entre Atg3 y LC3 | Inhibe caspasa 8 |

Uno de los principales mecanismos por los cuales la autofagia disminuye la tendencia de las células a morir por apoptosis es la mitofagia (Youle and Narendra 2011). En la mitocondria convergen las señales de supervivencia y muerte celular que determinan si se produce la apoptosis intrínseca vía MOMP. Durante la muerte celular, MOMP causa la liberación de hidrolasas y activadores de caspasas desde la mitocondria que producen la disipación del potencial de la membrana mitocondrial. Esto desencadena una catástrofe bioenergética que implican un punto de no retorno en la apoptosis intrínseca (Galluzzi et al. 2012a). Las mitocondrias dañadas son susceptibles de activar el programa

apoptótico, por lo que su eliminación por medio de la autofagia puede aumentar el umbral de la inducción de la apoptosis.

La autofagia puede también atenuar la muerte celular por una reducción selectiva de las proteínas pro-apoptóticas en el citosol. De esta forma, determinadas proteínas que han sido ubiquitinadas pueden ser eliminadas a través de la autofagia con la participación de proteínas reguladoras como p62 que une tanto sustratos ubiquitinados como LC3 (Shaid et al. 2013).

En sentido contrario, cuando la intensidad y la duración del estrés celular superan los límites soportables para la vida celular, los programas de muerte celular se activan y se produce el "suicidio" de la célula. La modalidad más frecuente de muerte celular es la apoptosis, y generalmente va acompañada por la activación de caspasas. Las caspasas pueden eliminar algunas proteínas autofágicas esenciales como son Atg3 (Oral et al. 2012) o Beclin1 (Wirawan et al. 2010) lo que produce la inactivación de la autofagia. La rotura de Atg3 se produce a través de la caspasa 8, con lo que un aumento de la expresión de caspasa 8 conlleva la degradación de Atg3, mientras que cuando se producen mutaciones en la zona de ruptura de Atg3 por caspasa 8 se previene la rotura y con ello, la inhibición de la autofagia. Este hecho confirma que Atg3 es un objetivo directo de la caspasa 8 (Oral et al. 2012).

Además, la proteína autofágica AMBRA1 que participa en los pasos iniciales del proceso de autofagia es degradada irreversiblemente por la acción combinada de calpaínas y caspasas (Corazzari et al. 2012; Pagliarini et al. 2012). Por otro lado, los fragmentos de proteínas autofágicas resultantes de la degradación por las caspasas podrían adquirir una función pro-apoptótica. En el caso de la proteína Beclin1, el fragmento carboxi-terminal resultante de la acción de la caspasa 3, 6 y 9 que se localiza en la mitocondria es responsable de liberar el citocromo c (Wirawan et al. 2010). De modo similar, la rotura de Atg5 por calpaínas genera un fragmento amino terminal que migra a la mitocondria donde se asocia a Bcl-X_L e induce la liberación del citocromo c que promueve la apoptosis. Además el fragmento de Atg5 promueve la fragmentación nuclear y previene la acumulación de la proteína LC3-II. Estos hallazgos confirman la capacidad del fragmento Atg5 para inducir directamente la apoptosis y no la autofagia (Yousefi et al. 2006).

Por otra parte, es posible que se produzca la activación del proceso apoptótico por la autofagia a través de un mecanismo conocido como muerte celular autofágica. Este proceso supone la supresión de la autofagia por la inhibición, disminución o eliminación de genes esenciales autofágicos y/o proteínas que previenen de la muerte celular (Galluzzi et al. 2012b; Shen et al. 2012). Por otro parte, algunos genes ATG están implicados tanto en la autofagia como la endocitosis y la secreción de proteínas (Manjithaya and Subramani 2011; Shrivastava et al. 2013).

Además de las proteínas autofágicas, los autofagosomas también parecen estar implicados en la regulación de la apoptosis. Se ha descrito la asociación de la caspasa 8 con la membrana del autofagosoma. Esta caspasa forma un complejo junto con FADD y Atg5, y su activación es dependiente de la proteína p62 (Hou et al. 2010; Altman and Rathmell 2012).

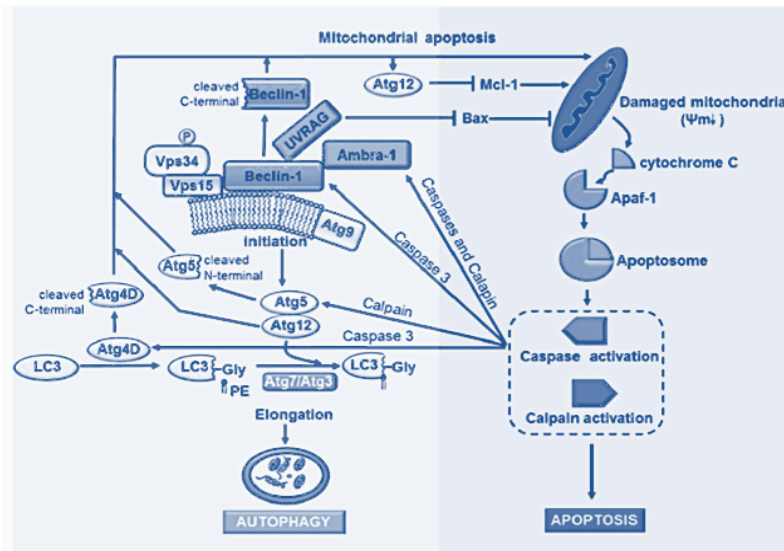
Otra vía de estimulación de la apoptosis es la eliminación de inhibidores endógenos de esta vía que son conocidos como IAPs (inhibitor of apoptosis proteins) y que controlan a las caspasas; una de las más conocidas es Bruce. Para escapar de la inhibición ejercida por IAP, la mitocondria puede liberar proteínas que pueden unirse a ellas o romperlas (Galluzzi et al. 2012a).

Por otro lado, la autofagia puede desencadenar la muerte por necrosis que se produce como resultado de un daño agudo, no fisiológico y accidental. Este tipo de muerte celular está asociado a la lisis celular como consecuencia de un daño en la membrana y la liberación de los constituyentes celulares al espacio extracelular, lo que produce una inflamación local y el daño a los tejidos próximos (Ryter et al. 2014). La activación de la necrosis esta mediado por la acumulación de autofagosomas que puede provocar la apertura del poro de transición de permeabilidad de la mitocondria y desencadenar la autofagia (Ma et al. 2012).

Otro grupo de proteínas que pueden activar la apoptosis son las Atg (figura 1). Este es el caso de Atg12 que activa a las caspasas vía mitocondrial. Este efecto se ejerce a través del dominio BH3 que media su unión con Bcl-2 y MCL1 y promueve la apoptosis sin necesidad de activar la autofagia (Rubinstein et al. 2011). El complejo formado por Atg12 y Atg5 controla la homeostasis mitocondrial y la muerte celular. Este complejo sensibiliza a las células a la apoptosis intrínseca sin afectar a la extrínseca. Cuando se produce la ruptura de

este complejo, se produce un aumento de las mitocondrias, se desintegra el entramado mitocondrial y se produce una resistencia a la apoptosis intrínseca (Radoshevich et al. 2010).

FIGURA 1 Proteínas autofágicas en la apoptosis intrínseca (Mukhopadhyay et al. 2014).



Del mismo modo ocurre con la proteína Atg7 que induce la muerte celular tras el daño lisosomal al desencadenar la permeabilización de la membrana del lisosoma (Kessel et al. 2012); o con Atg5, que además de intervenir en la formación de los autofagosomas, puede sufrir una modificación postranslacional por la acción de una calpaína y ejercer un efecto pro-apoptótico (Codogno and Meijer 2006).

Como se ha descrito en el capítulo, los procesos de degradación proteica (autofagia y proteasoma) y de muerte celular programada están muy relacionados, y su estudio debería llevarse a cabo como un conjunto, no como procesos aislados.

2.6 METABOLISMO DE LÍPIDOS EN ELA

En pacientes con la enfermedad de ELA, una de las complicaciones que se manifiestan ante el avance de la misma son las alteraciones energéticas que surgen como consecuencia de un desequilibrio entre la ingesta de alimentos y la energía disponible en el organismo (Braun et al. 2012; Muscaritoli et al. 2012). Estos pacientes pueden llevar asociadas a su patología alteraciones del metabolismo como son las dislipidemias, una disminución de la masa corporal y un incremento del gasto energético en reposo (Funalot et al. 2009; Dupuis et al. 2011). Del mismo modo ocurre en los modelos animales de la enfermedad, los animales transgénicos que portan la mSOD1 se caracterizan por tener un peso corporal menor que los WT, ser hipermetabólicos, e hipolipidémicos y presentar un incremento del consumo de ácidos grasos en el músculo (Dupuis et al. 2004; Fergani et al. 2007; Kim et al. 2011).

Tal y como se ha expuesto en el capítulo anterior, la autofagia está presente en la enfermedad y, además, existe una relación entre este proceso y el metabolismo de los lípidos.

2.5.1 METABOLISMO DE LÍPIDOS Y AUTOFAGIA

A nivel intracelular, los lípidos son cruciales para el mantenimiento de la homeostasis de la energía celular. En momentos de escasez de nutrientes, las reservas celulares de lípidos (triglicéridos en forma de gotas de grasa) se hidrolizan en ácidos grasos para producir energía, a la vez que se induce la autofagia como otra fuente de energía extra a partir de la degradación de proteínas y orgánulos celulares. Por lo tanto, si la falta de nutrientes provoca la movilización de los lípidos, se podrían pensar que la autofagia y el metabolismo lipídico comparten similitudes regulatorias y funcionales. Además, se ha

demostrado que los lisosomas tienen la capacidad de degradar lípidos gracias a la presencia de lipasas lisosomales o lipasas ácidas en su interior, lo que se conoce con el término de lipofagia (Singh et al. 2009; Singh and Cuervo 2012). Numerosos trabajos han demostrado que la activación de la lipofagia se produce como respuesta a los cambios en el contenido lipídico de la célula en tejidos como el neuronal (Nowicki et al. 2010), el muscular o el hepático (Cahova et al. 2010) entre otros; aunque el mecanismo que modula la activación del proceso autofágico todavía no está definido (Singh and Cuervo 2012).

La exposición a ácidos grasos insaturados como el ácido oleico ejerce un efecto estimulador sobre la autofagia en función de la concentración aplicada (Koga et al. 2010; Mei et al. 2011), mientras que el ácido palmítico, que es un ácido graso saturado, permanece en el citosol a altas concentraciones e inhibe la autofagia en células hepáticas (Mei et al. 2011). En los animales expuestos a una dieta alta en grasa durante períodos prolongados de tiempo, es posible detectar un aumento en la actividad autofágica durante las primeras semanas de tratamiento, que es seguido progresivamente por una disminución gradual en la autofagia.

Aunque muchos mecanismos pueden contribuir al efecto inhibitorio ejercido por los ácidos grasos libres en la autofagia, el análisis del proceso de autofagia ha puesto de manifiesto la presencia de un defecto en la fusión entre los autofagosomas y los lisosomas en las células expuestas a altas concentraciones de ácidos grasos libres o en animales sometidos a una dieta alta en grasa de forma prolongada en el tiempo. El análisis de estas vacuolas autofágicas ha revelado que las alteraciones en la composición lipídica de la membrana de estas vesículas puede influir en el proceso de unión del autofagosoma con el lisosoma (Koga et al. 2010).

2.5.2 METABOLISMO ENERGÉTICO

Las alteraciones del metabolismo de lípidos están presentes tanto en las motoneuronas como en el músculo de los ratones mSOD1 y de los pacientes de ELA.

En los últimos diez años el número de estudios relacionados con las alteraciones metabólicas en pacientes de ELA han ido aumentando. Los estudios epidemiológicos han demostrado que existe una asociación entre la nutrición y el riesgo de padecer ELA. Un primer estudio llevado a cabo en Japón en el año 2007 demostró que una alta ingesta de carbohidratos junto con un bajo consumo de grasas aumenta el riesgo de padecer ELA (Okamoto et al. 2007). Por el contrario, el seguimiento durante 10 años de un grupo formado por población general ha puesto en evidencia que el consumo de alimentos con un alto contenido en grasa reduce el riesgo de desarrollar la enfermedad (Gallo et al. 2013). Estos datos son coherentes con los encontrados en el modelo de ratones SOD1 que muestran una disminución de su supervivencia cuando se disminuye el aporte calórico de su dieta (Hamadeh et al. 2005; Patel et al. 2010). Cuando los ratones mSOD1 ingieren una mayor cantidad de calorías, este incremento calórico resulta beneficioso para ellos. Así, una dieta rica en lípidos administrada a ratones SOD1 normalizó los valores de masa corporal y restauró la adiposidad, retrasó el comienzo de los síntomas motores y de la degeneración de la motoneurona, y además aumentó la supervivencia en un 20% (Dupuis et al. 2004). Estos resultados han sido corroborados por los trabajos que posteriormente realizaron los grupos de Camandola y Pasinetti (Mattson et al. 2007; Zhao et al. 2012).

En pacientes de ELA se ha estudiado la relación entre los lípidos y la progresión de la enfermedad a través de la cuantificación de los lípidos circulantes. Los resultados indican que en estos enfermos se produce una dislipidemia, que además correlaciona positivamente con un aumento de la supervivencia. Este aumento puede alcanzar hasta los 13 meses en el caso de los pacientes con un mayor ratio HDL/LDL (Dupuis et al. 2008). Otros grupos de trabajo han demostrado también que tanto la hiperlipidemia como el aumento de la masa corporal tienen un mayor pronóstico de supervivencia (Dorst et al. 2011; Paganoni et al. 2011; Shimizu et al. 2012; Reich-Slotky et al. 2013). Uno de los últimos trabajos llevados a cabo han puesto de manifiesto que la presencia de grasa subcutánea correlaciona de modo positivo con la supervivencia (Kouroku et al. 2007); mientras que un ratio HDL/LDL bajo o una disminución rápida del índice de masa corporal está asociado con un declive más rápido en estos

pacientes (Jawaid et al. 2010). Además, un estado nutricional pobre tiene un peor pronóstico de la progresión de la enfermedad (Marin et al. 2011).

Por otra parte, en situaciones de hipoglucemia, las neuronas pueden usar los cuerpos cetónicos en caso de un alto requerimiento energético (LaManna et al. 2009), y en esta situación, los astrocitos pueden utilizar los lípidos para proporcionar los cuerpos cetónicos a las motoneuronas en caso de necesidad (Yi et al. 2011). En los ratones SOD1, la administración de triglicéridos de cadena media, que son precursores de los cuerpos cetónicos, preservan las funciones motoras y la supervivencia de las motoneuronas por medio del aumento del metabolismo de los lípidos (Zhao et al. 2012). Además, en pacientes de ELA se ha observado un aumento de los cuerpos cetónicos en el fluido cerebroespinal que proceden de la ruptura de ácidos grasos (Blasco et al. 2010) lo que podría indicar una alteración en la beta oxidación de los lípidos.

En relación con el tejido muscular, los ratones SOD1 presentan un alto requerimiento energético (Dupuis et al. 2004) que se relaciona con una mayor necesidad de ácidos grasos y con cambios en el patrón de expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico (Fergani et al. 2007; Gonzalez de Aguilar et al. 2008; Thau et al. 2012). En el caso de los pacientes de ELA, se ha descrito un predominio del metabolismo oxidativo y deficiencias en la función de la cadena mitocondrial oxidativa en el músculo (Crugnola et al. 2010). Las alteraciones descritas en las funciones energéticas de la mitocondria podrían contribuir a la atrofia del músculo en la enfermedad de ELA (Zhou et al. 2010).

A modo de resumen, a continuación se recogen en las siguientes tablas, los estudios relacionados con el metabolismo energético que se han realizado en pacientes (tabla 1) y en modelos animales de ELA (tabla 2).

TABLA 1 Estudios relacionados con el metabolismo energético en pacientes de ELA (Schmitt et al. 2014).

| | TAMAÑO MUESTRA | CONCLUSIONES | REFERENCIA |
|-------------------------------------|----------------|--|----------------------------|
| Metabolismo basal | n=44 | Pacientes ELA son hipermetabólicos. | (Funalot et al. 2009) |
| Epidemiología y riesgo a ELA | n=153 | Ingesta alta de carbohidratos y baja de lípidos aumenta el riesgo de ELA | (Okamoto et al. 2007) |
| | n=222 | Alto contenido en grasa corporal reduce el riesgo de padecer ELA. | (Gallo et al. 2013) |
| Lípidos y prognosis | n=369 | LDL/HDL alto correlaciona con aumento supervivencia | (Dupuis et al. 2008) |
| | n=658 | Hiperlipidemia no correlaciona con aumento supervivencia | (Chio et al. 2009) |
| | n=658 | LDL/HDL bajo correlaciona con disfunción respiratoria | (Chio et al. 2009) |
| | n=285 | BMI bajo correlaciona con declive rápido | (Jawaid et al. 2010) |
| | n=92 | Estatus nutricional pobre asociado a alta mortalidad | (Marín et al. 2011) |
| | n=488 | Colesterol y triglicéridos altos correlacionan con mayor supervivencia. | (Dorst et al. 2011) |
| | n=427 | BMI alto correlaciona con mayor supervivencia | (Paganoni et al. 2011) |
| | n=77 | Alta reducción BMI predice declive rápido | (Shimizu et al. 2012) |
| | n=150 | Alto BMI correlaciona con un declive de la puntuación ALSFRS más lento | (Reich-Slotky et al. 2013) |
| | n=62 | Alta grasa subcutánea correlaciona positivamente con supervivencia | (Lindauer et al. 2013) |

TABLA 2 Estudios relacionados con el metabolismo energético en modelo murinos de ELA (Schmitt et al. 2014).

| MODELO | TAMAÑO MUESTRA | CONCLUSIONES | REFERENCIA |
|-----------------|----------------|--|-----------------------|
| SOD1G93A | n=8 | Composición alterada de lípidos en la medula espinal | (Cutler et al. 2002) |
| | n=13 | Dieta alta en grasa retrasa el comienzo de la enfermedad y aumenta la supervivencia. | (Dupuis et al. 2004) |
| | n=27 | Dieta cetogénica protege frente a la muerte de la motoneurona | (Zhao et al. 2006) |
| | n=15 | Hipolipidemia | (Fergani et al. 2007) |
| | n=49□+31□ | Restricción calórica disminuye la supervivencia con aumento de peroxidación lipídica, inflamación y apoptosis. | (Patel et al. 2010) |
| | n=30□ | Hipolipidemia en el estadio presintomático de la enfermedad. | (Kim et al. 2011) |
| | n=machos | Triglicéridos de cadena acorta protegen motoneuronas, pero no aumenta supervivencia | (Zhao et al. 2012) |
| SOD1G86R | n=7-8 | Defecto dramático en la homeostasis energética e hipermetabolismo de origen muscular | (Dupuis et al. 2004) |
| | n=10 | Hipolipidemia | (Fergani et al. 2007) |

Tal y como se acaba de describir, los estudios preclínicos y la investigación básica han demostrado que un nivel alto de lípidos correlaciona con una mejor

prognosis de la enfermedad. Estos datos sugieren que una dieta suplementada con lípidos puede ser una terapia prometedora para el tratamiento del ELA.

2.5.3 TRATAMIENTO DE LA ELA CON LÍPIDOS

Cuando los ratones mSOD1 ingieren una mayor cantidad de calorías, este incremento calórico resulta beneficioso para ellos (tabla 2). Así, una dieta rica en lípidos administrada a ratones SOD1 normalizó los valores de masa corporal y restauró la adiposidad, retrasó el comienzo de los síntomas motores y de la degeneración de la motoneurona, y además aumentó la supervivencia en un 20% (Dupuis et al. 2004). Estos resultados han sido corroborados por los trabajos que posteriormente realizaron los grupos de Camandola y Pasinetti (Mattson et al. 2007; Zhao et al. 2012).

En la actualidad se están realizando varios ensayos clínicos en relación con la nutrición con la finalidad de conocer más exactamente que sucede en los pacientes. A nivel farmacológico, se está analizando el medicamento Olanzapine (10 mg/día) para tratar la pérdida de apetito (NCT00876772; *clinicaltrial.gov*), pero hasta el momento no se han publicado los resultados. Sin embargo, el ensayo con el medicamento Pioglitazone (45 mg/día) que es un anti-diabético, ha sido suspendido en fase II al no encontrarse beneficio alguno en su administración (NCT00690118; *clinicaltrial.gov*). En relación a las dietas suplementadas, se está administrando una dieta rica en grasa y alto contenido calórico para corregir la malnutrición (NCT00983983; *clinicaltrial.gov*) (Schmitt et al. 2014), además en pacientes de ELA con alimentación asistida por sonda de gastrostomía se está administrando una dieta cetogénica rica en grasas y baja en carbohidratos (NCT01016522; *clinicaltrial.gov*). Con estos ensayos se pretende prevenir el estado de malnutrición característico de estos pacientes (Schmitt et al. 2014).

También se está estudiando el metabolismo basal de los pacientes con ELA. Un primer ensayo, en vías de reclutamiento, pretende cuantificar el sustrato nutricional que utilizan estos pacientes (NCT00714220; *clinicaltrial.gov*), mientras que un segundo ensayo, se ha centrado en la influencia de la hiperlipidemia en la ELA (NCY01592084; *clinicaltrial.gov*) (Schmitt et al. 2014).

Por otra parte, tal y como quedo de manifiesto en el “IV Encuentro Nacional de personas con ELA e Investigadores” realizado el pasado mes de abril, se está llevando a cabo en España un ensayo con pacientes de ELA a los que se les está administrando como suplemento alimenticio el compuesto ALGATRIUM Plus que es un aceite omega 3 con un alto contenido en DHA (ácido docosahexaenoico), pero por el momento se desconocen los resultados.

El resultado de todos estos ensayos ayudará a determinar si la modulación de los lípidos, bien a nivel farmacológico o bien a modo de suplementación, puede ser un potencial tratamiento para la ELA.

3

OBJETIVOS

El objetivo general planteado en la presente memoria de Tesis Doctoral es conocer los procesos de degradación proteica y/o de muerte celular que tienen lugar en el modelo murino de ELA a lo largo de la enfermedad tanto en el Sistema Nervioso Central como en el músculo esquelético, además de estudiar el efecto de una dieta rica en lípidos sobre los mismos.

Para la consecución de este objetivo general se han propuesto los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar la actividad del proteasoma, el proceso de autofagia, así como el proceso de muerte celular programa por apoptosis a lo largo de la enfermedad en el músculo esquelético de los animales modelos SOD1G93A.
- Realizar un ensayo pre-clínico basado en la administración de una dieta rica en lípidos y estudiar cómo afecta a los parámetros de autofagia en el músculo esquelético de los animales modelos SOD1G93A.
- Estudiar la actividad del proteasoma y el proceso de autofagia a lo largo de la enfermedad en la médula espinal de los animales modelos SOD1G93A.

MATERIAL Y MÉTODOS

4

El trabajo descrito en este capítulo viene supeditado a la presentación del apartado de resultados y discusión, cuyo desarrollo es en forma de manuscritos. A pesar de que en cada uno de los artículos se describen los procedimientos específicos de cada trabajo, se ha considerado conveniente una descripción de los materiales y la metodología empleados en la elaboración de la presente Tesis Doctoral.

La infraestructura utilizada en el presente trabajo está disponible en el Laboratorio de Genética y Bioquímica (LAGENBIO), Toxicología, la Unidad de Experimentación Animal y en el Grupo de Mecánica Estructural y Modelado de Materiales (GEMM) del Instituto de Investigación de Ingeniería de Aragón.

4.1 MODELO ANIMAL

4.1.1 ASPECTOS GENERALES DEL MODELO MURINO SOD1^{G93A} DE ELA

El modelo animal utilizado en Los experimentos de este trabajo es el ratón transgénico de alta copia para el gen humano mutado SOD1 (G93A), con fondo genético de la cepa B6SJL (B6SJL-Tg(SOD1-G93A)1Gur/J) proveniente de la casa comercial The Jackson Laboratory. La colonia fue mantenida mediante el cruce de portadores hemicigóuticos machos con hembras híbridas B6SJLF1 provenientes de la casa comercial Janvier. Como controles para los experimentos se utilizaron ratones no transgénicos o wild-type (WT), preferiblemente hermanos de camada. Además, para el correcto diseño experimental de los ensayos se tuvo en cuenta el sesgo por el efecto del género y los grupos se balancearon en función del sexo.

Los animales fueron alojados en el Servicio de Animalario del Servicio General de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de Zaragoza, bajo las normas internacionales GLP (Good Laboratory Practices) y los acuerdos del Consejo de Europa sobre experimentación animal aplicada, recogidos en las Directivas 86/609/CEE y la 2010/63/UE y regulados en España por el Real Decreto 53/2013.

Además, todos los experimentos y procedimientos seguidos fueron aprobados por el Comité Ético para Animales de Experimentación de la Universidad de Zaragoza.

En todos los ensayos los animales tuvieron acceso a la comida y la bebida *ad libitum*, con ciclos de luz de 12 horas y condiciones ambientales de temperatura (21-23°C) y humedad relativa (55%) controlada. Las condiciones sanitarias fueron controladas mediante análisis bacteriológicos, parasitológicos y serológicos.

4.1.2 GENOTIPADO

La identificación de los ratones transgénicos y WT se realizó mediante la técnica PCR con el DNA extraído de los animales. Para la extracción del DNA genómico, una pequeña porción de tejido del ratón procedente de la cola se sometió a lisis con NaOH 50mM a 98 °C durante 30 minutos. Tras neutralizar la reacción con Tris 1M, se centrifugó la muestra a 12000g durante 5 minutos para separar el sobrenadante que es la porción que contiene el DNA.

El genotipado consiste en la amplificación simultánea de un fragmento del gen SOD1 humano mutado y del gen interleukina 2 (IL-2) como control de la reacción, y la visualización del o de los productos amplificados en un gel de agarosa al 1% con tinción de bromuro de etidio (tabla 1). Los animales no transgénicos o WT presentan una única banda de 324 pb (gen control de IL-2), mientras que los transgénicos presentan dos bandas (236 pb y 324 pb) que corresponden a la amplificación del gen hSOD1 mutado e IL-2, respectivamente.

TABLA 1 Secuencia de los primers empleados para el genotipado.

| GEN | PRIMER | SECUENCIA |
|-------|---------|-----------------------------------|
| IL-2 | OIMR042 | CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT |
| | OIMR043 | GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C |
| hSOD1 | OIMR113 | CAT CAG CCC TAA TCC ATC TGA |
| | OIMR114 | CGC GAC TAA CAA TCA AAG TGA |

4.1.3 EXTRACCION Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS ANIMALES

Los tejidos objeto de estudio del presente trabajo fueron el músculo cuádriceps y la médula espinal de ratones WT y transgénicos de ambos sexos a las edades de 40, 60, 90 y 120 días.

Estas edades se corresponden con los siguientes estadios de la enfermedad: asintomático a la edad de 40 días, sintomático temprano a los 60 días de vida, sintomático a los 90 días y estado terminal a los 120 días de edad.

Los ratones fueron sacrificados mediante asfixia en una cámara de CO₂. Posteriormente, ambos músculos cuádriceps y la médula espinal de cada animal fueron disecados y, en caso de no ser usados en ese momento, rápidamente congelados en nitrógeno líquido para su almacenamiento en un congelador a -80°C.

Los tejidos obtenidos (músculo y médula espinal) destinados al estudio bioquímico se pulverizaron con nitrógeno líquido por medio del sistema Cellcrusher™ (Cellcrusher). A partir de este punto, el tejido se dividió igualmente para el estudio génico y proteico. Esto permite realizar tanto el estudio proteico como el génico en los mismos animales y evitar los posibles errores debidos a la variabilidad entre animales.

Mientras que las muestras para los ensayos histológicos se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS durante 24 horas, y se criopreservaron en sacarosa al 30% durante 48 horas a 4 °C. Posteriormente, los tejidos fueron embebidos en una resina para congelación OCT™ Tissue-Tek (Sakura) y se congelaron en 2-metilbutano enfriado con nitrógeno. Los bloques se almacenaron a -80 ° C hasta el momento de su utilización.

Para realizar el corte de las muestras, primero los bloques se dejaron atemperar a -20°C en el criostato (CM1510S, Leica Microsystems) y se cortaron secciones transversales de 10 µm de grosor. Los cortes se recogieron en portaobjetos Superfrost®Plus (Thermo Fisher Scientific) que se almacenaron a -20°C hasta el momento de su uso.

4.2 PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL

4.2.1 EXTRACCIÓN DEL RNA TOTAL

Para realizar la extracción del RNA de las muestras, se utilizaron dos métodos distintos en función de las características especiales del tejido de partida. En el caso concreto de la médula espinal, por tratarse de un tejido rico en lípidos, fue necesaria la utilización de un protocolo específico.

En el caso del tejido muscular, el RNA se extrajo por medio del Trizol Reagent (Invitrogen) usando un homogenizador de muestras (IKA T10 UltraTurrax), seguido del tratamiento con cloroformo e isopropanol que separa y precipita el RNA respectivamente. Finalmente, se lavó con etanol al 75% y se resuspendió el RNA en agua DEPC.

Por otra parte, para la extracción del RNA de la médula espinal, se usó el kit comercial RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen) basado en un sistema de extracción y purificación por columnas, siguiéndose las indicaciones del fabricante.

4.2.2 SINTESIS DE DNA COMPLEMENTARIO O cDNA

Para evitar la presencia de DNA genómico en las muestras de RNA que podrían provocar amplificaciones inespecíficas en los estudios de expresión génica, 10 µg de RNA fueron tratados con la DNasa Turbo DNA-free (Ambion).

Seguidamente, y tras medir la concentración de RNA en un espectrofotómetro (NanoDrop ND-1000, Thermo Scientific), se sintetizó el cDNA a partir de 1 µg de RNA por medio del Super-Script™ First-Strand Synthesis System kit (Invitrogen).

4.2.3 PCR EN TIEMPO REAL (RT-PCR)

La PCR a tiempo real o RT-PCR es una técnica que permite amplificar y cuantificar simultáneamente una muestra de cDNA. Para cuantificar el número de copias del gen en estudio, se normalizaron los valores con genes normalizadores o housekeeping.

Se utilizaron sondas TaqMan® (Applied Biosystems) caracterizadas por ser oligonucleótidos modificados que emiten fluorescencia cuando hibridan específicamente con un DNA complementario. Las sondas empleadas en este trabajo aparecen citadas en la tabla 4.2.

Todas las reacciones se optimizaron para realizarse en un volumen final de 5 µl con 2.5 µl TaqMan® Universal PCR Master Mix, 0.25 µl de la sonda específica para cada gen, 2 µl de cDNA diluido 1/10 y agua DEPC para completar el volumen. Las reacciones se realizaron por duplicado en un ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems).

Como genes normalizadores se usaron los 2 genes endógenos GAPDH y β-actina, cuya media geométrica se utilizó para corregir la expresión de los genes objeto de estudio. Estos genes se seleccionaron basándonos en estudios previos realizados por nuestro laboratorio, en función del tipo de tejido, para nuestro modelo animal (Calvo et al. 2008). La expresión relativa de los genes se determinó usando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak and Schmittgen 2001). Este método, permite comparar el mismo gen en 2 muestras distintas tras la previa corrección con el gen normalizador en relación a su valor Ct o ciclo umbral (*cycle threshold*).

TABLA 2 Lista de sondas TaqMan® usadas para la RT-PCR.

| SONDA | REFERENCIA |
|--------------|-------------------|
| LC3 | Mm00458724_m1 |
| p62/SQSTM1 | Mm00448091_m1 |
| E2F1 | Mm00432939_m1 |
| ATG5 | Mm00504340_m1 |
| Beclin1 | Mm00517174_m1 |
| GAPDH | 4352932E |
| β-actina | 4352933E |

4.3 WESTERN BLOT

4.3.1 EXTRACCION Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEINA

El tejido pulverizado proveniente de músculo y médula espinal se homogenizó en una solución de lisis RIPA con antiproteasas (Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche) en frío. El homogenado se centrifugó a 10000g durante 10 minutos a 4°C, y se recuperó el sobrenadante.

Para cuantificar la proteína presente en las muestras, se utilizó el método del ácido bicinconínico o BCA. El sobrenadante de las muestras se sometió a una reacción colorimétrica y la absorbancia se midió a 562 nm en un espectrofotómetro (*Infinite F200, Tecan Ibérica Instrumentación*).

4.3.2 ELECTROFORESIS E INMUNODETECCIÓN

En un primer lugar se procedió a la electroforesis de las proteínas en un gel SDS-PAGE (tabla 4.3). Para ello, se desnaturalizaron las proteínas junto el buffer Laemmli durante 5 minutos a 98°C; tras lo cual, un total de 40 µg de proteína se resolvieron en un gel de acrilamida al 5-15% (tabla 4.4).

TABLA 3 Composición de las soluciones usadas en el Western blot.

| SOLUCIONES | COMPOSICIÓN |
|------------------------|---|
| Buffer RIPA | 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl a pH 7.5, 1% deoxicolato, 0.1% SDS y 1% tritón X-100 |
| Buffer Laemmli 2x | 100 mM Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% glicerol, 5% β-mercaptoetanol, 2.5% azul bromofenol al 0.5% etanol al 10% |
| Buffer gel inferior 4x | 1.5 M Tris-HCl pH 8.8 |
| Buffer gel superior 4x | 1.5 M Tris-HCl pH 6.8 |
| Buffer electroforesis | 50 mM Tris-HCl, 192 mM glicina, 0.2% SDS |
| Buffer transferencia | 50 mM Tris-HCl, 192 mM glicina, 20% metanol |
| TBS 10x | 200 mM Tris-HCl pH 8, 1.5 M NaCl |
| TTBS | 20 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20 |

A continuación, se transfirieron las proteínas del gel a una membrana de PVDF (Amersham Hybond™-P, GE). Para comprobar que la transferencia fue correcta, se tiñó la membrana con solución Ponceau (Sigma).

Para la inmunodetección de las proteínas, se bloquearon los sitios inespecíficos de la membrana con leche desnatada al 5% en TTBS en agitación a 4°C toda la noche. Al día siguiente, la membrana se incubó durante una hora a temperatura ambiente y en agitación con el anticuerpo primario en un 0.1% de BSA en TTBS (tabla 4.5). Se lavó seguidamente 3 veces durante 10 minutos con TTBS y se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con HRP durante una hora a temperatura ambiente en agitación. Finalmente, se lavó la membrana de nuevo 3 veces durante 10 minutos con TTBS. La inmunodetección se llevó a cabo aplicando un sustrato quimioluminiscente ECL (ECLplus, GE). Se expusieron las membranas en las películas radiográficas, y se realizó el análisis densitométrico de las bandas con el programa AlphaEase FC (Bonsai).

La normalización de los datos se realizó dividiendo las intensidades ópticas de cada proteína a estudio entre las de la proteína normalizadora GAPDH.

TABLA 4 Composición de los geles de acrilamida.

| | GEL SEPARACIÓN 15% | GEL CONCENTRACIÓN 5% |
|------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| Buffer 4x (ml) | 2.5 | 1.25 |
| Acrilamida (ml) | 3.75 | 0.625 |
| H ₂ O _d (ml) | 3.65 | 2.9 |
| SDS (μl) | 100 | 50 |
| TEMED (μl) | 15 | 10 |
| APS (μl) | 50 | 25 |

TABLA 5 Anticuerpos primarios y secundarios.

| | ANTICUERPO | PM (KDA) | DILUCIÓN | CASA COMERCIAL |
|-----------|-------------------|---------------------|-----------------|------------------------------------|
| 1° | LC3 | 18-16 | 1:1000 | PD014, MBL |
| | p62/SQSTM1 | 62 | 1:1000 | BML-PW9860, Enzo Life Sciences |
| | Bax | 23 | 1:1000 | sc-526, Santa Cruz Biotechnology |
| | Bcl2 | 26 | 1:1000 | sc-492, Santa Cruz Biotechnology |
| | Caspase-3 | 32-17 | 1:500 | 9662, Cell Signalling Technology |
| | GAPDH | 37 | 1:1000 | sc-25778, Santa Cruz Biotechnology |
| 2° | Goat anti-rabbit | - | 1:3000 | sc-2004, Santa Cruz Biotechnology |
| | Mouse anti-rabbit | - | 1:3000 | sc-2005, Santa Cruz Biotechnology |

4.4 DETECCIÓN DE APOPTOSIS: TUNEL

Además de la detección de proteínas relacionadas con la apoptosis, se realizó la determinación de la apoptosis a través del ensayo denominado TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling). El TUNEL consiste en la incorporación por parte de la enzima TdT (Terminal deoxynucleotidyl transferase) de nucleótidos modificados o marcados (dUTP) a la zonas terminales –OH de los ácidos nucleicos formados tras la fragmentación del DNA por la apoptosis.

Para este estudio, se usó el kit comercial In situ Cell Death Detection kit (Roche) que permite detectar y cuantificar la muerte celular sobre nuestras preparaciones de músculo y médula espinal de los animales. Para detectar los núcleos apoptóticos por medio de un microscopio de fluorescencia, se incorpora la fluoresceína como sistema de marcaje de los fragmentos de DNA. Como control positivo de la técnica se usaron muestras de tejido tratadas con DNasa I recombinante.

Al final del ensayo, las secciones se montaron con medio de montaje Vectashield con DAPI (Vector) que es un marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones enriquecidas en adenina y timina en secuencias de ADN y por tanto, es un marcador celular. El porcentaje de células apoptóticas se determina por el número de células positivas en relación al número total de células usando un microscopio de fluorescencia (Olympus IX81).

4.5 ENSAYO IN VITRO DE LA CLOROQUINA

Para evaluar el estado del proceso de autofagia en el músculo y la médula espinal de los animales se trataron las muestras con cloroquina. La cloroquina es

un fármaco del grupo de las 4-aminoquinolinas usado en el tratamiento y/o prevención de la malaria que, en el caso de la autofagia, impide la acidificación de los lisosomas, y por tanto, su eliminación. Como consecuencia de este bloqueo en el proceso autofágico, se produce una acumulación de la proteína LC3-II (presente en los autofagosomas) al interrumpirse la degradación de la misma.

Los músculos cuádriceps y la médula espinal de los ratones de 90 y 120 días de edad fueron disecados y troceados en pequeñas porciones. Tras lavar los tejidos con PBS, los explantos se incubaron en DMEM con 10% (v/v) de suero fetal bovino y cloroquina 100 μM (Sigma) durante 6 horas a 37°C y un 5% de CO_2 . Finalmente, se lavaron los tejidos y se extrajo la proteína para poder evaluar con la técnica de WB los niveles de la expresión proteica de LC3-II en cada una de las muestras.

4.6 ACTIVIDAD PROTEASOMA

4.6.1 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN PROTEÍNA

El proteasoma como sistema proteolítico puede realizar 3 tipos de actividades catalíticas distintas, como son la actividad de la quimotripsina, la de la tripsina y la de la caspasa. Para evaluar la actividad enzimática del sistema proteasomal se ha usado un kit comercial capaz de detectar dicha actividad.

Al tratarse de un ensayo que evalúa la actividad enzimática del proteasoma, la medida de dicha actividad requiere el uso de muestras proteicas frescas que no hayan sido sometidas a ciclos de congelación/descongelación (Strucksberg et al. 2010).

Para ello, tras su disecación, dichas muestras de cuádriceps y médula espinal de los ratones se homogenizaron en buffer frío (20 mM TrisHCl pH 7.5 y 2 mM EDTA) el mismo día que se realizó la determinación de la actividad. Las muestras se centrifugaron a 15000g durante 10 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante.

La determinación de la concentración proteica se realizó por el método BCA y una cantidad total de 10 µg de proteína se usó para el ensayo.

4.6.2 MEDIDA ACTIVIDAD PROTEASOMA 26S

Para medir la actividad del proteasoma 26S se usó el kit comercial CHEMICON® Proteasome Activity Assay Kit (Millipore). Los extractos proteicos se incubaron durante 2 horas a 37°C con el sustrato marcado LLVY-7-amino-4-methylcoumarin y la actividad enzimática se determinó por detección del fluoróforo libre 7-amino-4-methylcoumarin (AMC). La fluorescencia emitida por AMC se midió usando un lector de placas (Infinite F200 PRO, TECAN) con un rango de excitación de 360 nm y de emisión de 460 nm.

4.7 PRUEBAS DE COMPORTAMIENTO EN EL MODELO ANIMAL

La evaluación del comportamiento motor de los animales se llevó a cabo por medio de una serie de pruebas como son el test del rotarod, el de la rejilla y el treadmill. Además, se realizó un control sobre la evolución del peso y la supervivencia de los ratones a medida que se desarrolla la enfermedad.

El registro de estas pruebas se hizo semanalmente, siempre por las mañanas. Para evitar comportamientos anómalos en los animales que pudieran alterar los resultados de las pruebas, se comenzó siempre con los machos y tras evaluar cada animal, los aparatos se limpiaron en profundidad.

4.7.1 PESO

Previo a la realización de las pruebas de comportamiento, los ratones se pesaron en una balanza electrónica (VIPER SW 3, Mettler Toledo).

4.7.2 TEST DEL ROTAROD

El rotarod es un test que nos permite evaluar la coordinación, el equilibrio y la fuerza motora. El aparato consiste en un cilindro que gira de modo continuo a una velocidad constante de 14 rpm y presenta 5 compartimentos independientes para evitar el contacto entre los ratones (RotaRod/RS, LE8200, LSI-LETICA Scientific Instruments).

Para el correcto desarrollo de la prueba, fue necesario entrenar los ratones una semana antes de comenzar con el ensayo, y se descartaron aquellos animales que a pesar de no tener ninguna dificultad motora, no fueron capaces de superarla (falta de atención, nerviosismo...).

Cada ratón tuvo tres oportunidades y se registró el tiempo máximo que los ratones permanecieron sin caer, tomando como tiempo límite 180 segundos.

4.7.3 TEST DE LA REJILLA

A través de este test se evalúa la fuerza muscular y el punto en el cual se produce el comienzo de los síntomas de la enfermedad. Cada animal es colocado sobre una rejilla, que se gira 180° y deja al animal suspendido de ella.

Al igual que se hace en la prueba del rotarod, los ratones dispusieron de 3 intentos y un tiempo máximo de 180 segundos. Se registró el tiempo máximo que aguantaron los ratones en suspensión sin caer.

4.7.4 TREADMILL

Para la realización de esta prueba, los animales fueron sometidos a ejercicio involuntario en una cinta de correr para pequeños roedores (1055SDRM Columbus Instruments). La actividad motora se registró 3 días a la semana a partir de los 45 días de edad. Para animar a los ratones a correr y evitar que se queden parados en la parte final de la cinta, el sistema está equipado con una rejilla electrificada en la parte inferior que produce una leve descarga 0,3 mA que no daña o hiere a los animales. Se analizaron tres velocidades (11, 22 y 44 cm/s) durante 10 minutos con una inclinación de la cinta de 5 °. Los resultados de la prueba se miden en relación con el tiempo que cada ratón permanece en la zona electrificada. De esta forma, a medida que avanza la enfermedad

de un animal, aumenta el tiempo que pasa en la rejilla electrificada y disminuye el tiempo que pasa corriendo sobre la cinta transportadora.

4.7.5 SUPERVIVENCIA

Debido a la severidad del modelo murino empleado para este trabajo, fue necesario establecer un punto final en la vida de estos animales para proceder a su sacrificio. El punto final tiene lugar cuando el animal permanece más de 30 segundos colocado en posición decúbito y no es capaz de girarse por sí mismo (Azzouz et al. 2004), procediéndose al sacrificio del mismo en una cámara de CO₂.

4.8 HERRAMIENTAS BIOINFORMATICAS Y ESTADÍSTICA

4.8.1 HERRAMIENTAS BIOINFORMATICAS

A la hora de elaborar el presente trabajo se necesitaron programas informáticos tanto para el análisis como para el procesamiento de los resultados obtenidos en los distintos ensayos realizados.

A continuación se enumeran los distintos programas:

- Análisis de secuencias y productos amplificados por la RT-PCR: StepOne™ software v2.0. (Applied Biosystems).
- Análisis densitométrico de las bandas del Western Blot: AlphaEase®FC (Alpha Innotech).

4.8.2 HERRAMIENTAS ESTADÍSTICAS

Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos se empleó el programa SPSS 19.0. (IBM).

Como paso previo, se hizo un estudio de la normalidad por el test de Shapiro-Wilk. Tras comprobar la normalidad de los datos, se llevó a cabo el análisis de los

mismos con la prueba t de Student, considerando el umbral de significación estadística $p < 0,05$. Todos los valores se expresaron como medias y las barras de error representan el error estándar de la media (SEM).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



La presentación de los resultados obtenidos en este trabajo y la discusión de los mismos se realizará en forma de manuscritos, es decir, artículos publicados, enviados o en preparación.

En primer lugar, se determinó la importancia y la necesidad de la utilización de grupos experimentales balanceados respecto al sexo en nuestro modelo murino de ELA a la hora de diseñar los procedimientos experimentales. Para ello se analizó la expresión, tanto a nivel génico como proteico, de los principales marcados autofágicos (LC3 y p62) en el músculo esquelético y la médula espinal de ratones wild type machos y hembras. Los resultados indican que entre machos y hembras existen diferencias en la expresión de ambos marcadores en ambos tejidos en las edades objeto de estudio, lo que indica que es necesario la utilización de los dos sexos a la hora de normalizar los datos experimentales **(Manuscrito 1)**.

Una vez comprobada la existencia de diferencias en los patrones de expresión de ambos marcadores entre los dos sexos, en un primer lugar se procedió al estudio de los procesos de degradación proteica (autofagia y proteasoma) y de muerte celular programada en el músculo esquelético a lo largo de la enfermedad. Los resultados muestran que en los ratones SOD1G93 la activación de los procesos de degradación proteica no se produjo hasta los estadios sintomáticos tempranos de la enfermedad, ya que no se observa ninguna activación a los 40 días de edad de los animales modelo. Así, en el estadio sintomático temprano que se corresponde a la edad de 60 días, la actividad enzimática del proteasoma aumentó de modo significativo, mientras que en resto de los estadios de la enfermedad, dicha actividad estuvo disminuida. En cuanto a la activación de la autofagia, ésta no se produjo hasta el estadio terminal de la enfermedad (120 días). Estos resultados indican que se produce un efecto compensatorio entre ambos procesos a lo largo de la enfermedad. En relación a la evaluación del proceso de muerte celular, los datos obtenidos indicaron que en este tejido no se activa la apoptosis en ninguna de las edades objeto de estudio **(Manuscrito 2)**.

Tras la caracterización del proceso autofágico, y conocido el hecho de que tanto los pacientes como los ratones modelo presentan una alteración del metabolismo de los lípidos a nivel muscular que puede ir asociado a una

activación de la autofagia, se analizó el efecto de una dieta enriquecida con ácidos grasos en nuestros ratones modelo.

Sin embargo, antes de evaluar el efecto de dicha dieta sobre el comportamiento motor de los ratones modelo, se han comparado varias pruebas de comportamiento como son el test del rotarod, de la rejilla y el treadmill para seleccionar aquellas que presentan una mayor sensibilidad. Los resultados obtenidos muestran que tanto la prueba del rotarod como la de la rejilla permiten detectar alteraciones tempranas en la motilidad de los ratones modelo, así como realizar una caracterización de su comportamiento **(Manuscrito 3)**.

Tras este trabajo, se ha estudiado el posible efecto terapéutico de la administración de una dieta enriquecida con lípidos, y más concretamente con aceite de oliva extra virgen y de palma, en los ratones modelo. Los resultados obtenidos tras la ingesta de una dieta enriquecida con aceite de oliva virgen extra, rico en ácidos grasos insaturados, muestran una mejora en el comportamiento motor y un aumento de la supervivencia de 15 días, además de un beneficio en el estado histológico del músculo como demuestra el aumento del tamaño de las fibras. Además, el aceite de oliva mejora los indicadores moleculares de autofagia analizados en el músculo de los ratones SOD1G93A en los estadios terminales de la enfermedad, así como los parámetros de estrés asociado al retículo endoplasmático y al daño muscular. Sin embargo, en las mismas condiciones experimentales, la ingesta de una dieta enriquecida con aceite de palma (rico en ácidos grasos saturados) no muestra un efecto beneficioso en ninguno de los parámetros anteriormente evaluados. Por tanto, la naturaleza y/o composición del lípido administrado parece ser determinante para un posible efecto beneficioso sobre la enfermedad **(Manuscrito 4)**.

Por último, debido a la escasez de estudios sobre los procesos de degradación proteica en la médula espinal de los animales modelo, se llevó a cabo la evaluación de dichos procesos. El análisis de los datos obtenidos indica que ambos procesos aparecen alterados a lo largo de la enfermedad en la médula espinal de los animales modelo. Así, la autofagia no presenta un papel tan relevante como en el músculo y la activación del proteasoma se produce sólo en los estadios terminales de la enfermedad **(Manuscrito 5)**.

A continuación se enumeran los manuscritos a los que se ha hecho mención anteriormente:

- Manuscrito 1.** Oliván S, Calvo AC, Manzano R, Zaragoza P, Osta R. **Sex differences in constitutive autophagy.** *Biomed Research International*. 2014;2014:652817.
- Manuscrito 2.** Oliván S, Calvo AC, Gasco S, Muñoz MJ, Zaragoza P, Osta R. **Time-point dependent activation of autophagy and the UPS in the skeletal muscle from SOD1G93A mice.**
- Manuscrito 3.** Oliván S, Calvo AC, Rando A, Muñoz MJ, Zaragoza P, Osta R. **Comparative study of behavioural tests in the SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis.**
- Manuscrito 4.** Oliván S, Martínez-Beamonte R, Calvo AC, Surra JC, Manzano R, Arnal C, Osta R, Osada J. **Extra virgin olive oil intake delays the development of Amyotrophic Lateral Sclerosis associated with reduced reticulum stress and autophagy in muscle of SOD1G93A mice.** *Journal of Nutritional Biochemistry (in press)*.
- Manuscrito 5.** Oliván S, Calvo AC, Herrera M, Zaragoza P, Osta R. **The interplay between defective autophagy and UPS activation in SOD1G93A mice spinal cord.** *En preparación*.

5.1 MANUSCRITO 1



Sex differences in constitutive autophagy

Oliván S, Calvo AC, Manzano R, Zaragoza P, Osta R

Biomed Res Int. 2014;2014:652817. doi: 10.1155/2014/652817.

Research Article

Sex Differences in Constitutive Autophagy

Sara Oliván, Ana Cristina Calvo, Raquel Manzano, Pilar Zaragoza, and Rosario Osta

LAGENBIO-13A, Veterinary School, University of Zaragoza, Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza, Spain

Correspondence should be addressed to Rosario Osta; osta@unizar.es

Received 19 November 2013; Revised 13 January 2014; Accepted 27 January 2014; Published 27 February 2014

Academic Editor: Patrick G. Kehoe

Copyright © 2014 Sara Oliván et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Sex bias has been described nowadays in biomedical research on animal models, although sexual dimorphism has been confirmed widely under pathological and physiological conditions. The main objective of our work was to study the sex differences in constitutive autophagy in spinal cord and skeletal muscle tissue from wild type mice. To examine the influence of sex on autophagy, mRNA and proteins were extracted from male and female mice tissues. The expressions of microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) and sequestosome 1 (p62), markers to monitor autophagy, were analyzed at 40, 60, 90, and 120 days of age. We found significant sex differences in the expression of LC3 and p62 in both tissues at these ages. The results indicated that sex and tissue specific differences exist in constitutive autophagy. These data underlined the need to include both sexes in the experimental groups to minimize any sex bias.

1. Introduction

In biomedical research, single-sex studies (generally males) still predominate. Moreover, a high number of studies either fail to specify the sex used or the two sexes are not analyzed separately. In neuroscience or pharmacology, for example, a higher number of studies are conducted in males (5.5:1 or 5:1) albeit gender differences have been previously described [1]. However, an increasing number of investigations about the influence of gender in human disorders (cancer, neurodegenerative, or cardiovascular diseases) or fundamental biological pathways, such as autophagy, are currently being carried out.

Autophagy is a dynamic system for degrading misfolded and/or damaged proteins and, therefore, for maintaining the cellular homeostasis [2]. During this process, small portions of cytoplasm are sequestered by a double membrane bound vesicles called autophagosomes and consequently degraded when they fuse with lysosomes to form an autolysosome. Cellular autophagic activity is usually low under normal physiological conditions (constitutive autophagy) but can be markedly upregulated by numerous stimuli (starvation, hypoxia, or infections) or suppressed as documented in the case of neurodegenerative disorders and cancer [3].

Specifically in neural cells, the role of constitutive autophagy has been studied and the results indicate that it is essential to prevent certain neurodegenerative diseases [4, 5].

Sex-dependent differences in the activation of the autophagic cytoprotection pathway have long been reported *in vitro*. During starvation, cultured male neurons readily undergo autophagy and die, whereas neurons from females mobilize fatty acids, accumulate triglycerides, form lipid droplets, and survive longer [6, 7]. However, only in few cases, the possible gender-associated differences in autophagy have been investigated *in vivo* and are still less in normal physiological conditions [7–9]. Recent studies have also shown not only a sexual dimorphism in autophagy but also tissue specificity in constitutive autophagy in adult rats [9].

The aim of this study was to investigate the sex differences in autophagy under normal physiological conditions in spinal cord and muscle tissue from wild type mice. RNA and protein level expression of the microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) and p62/sequestosome 1 (p62) were assessed, as these are the most commonly used markers to monitor autophagy. LC3 is associated with completed autophagosome, while p62 becomes incorporated into the completed autophagosome through its direct binding to LC3 and is subsequently degraded in the autolysosomes [9, 10].

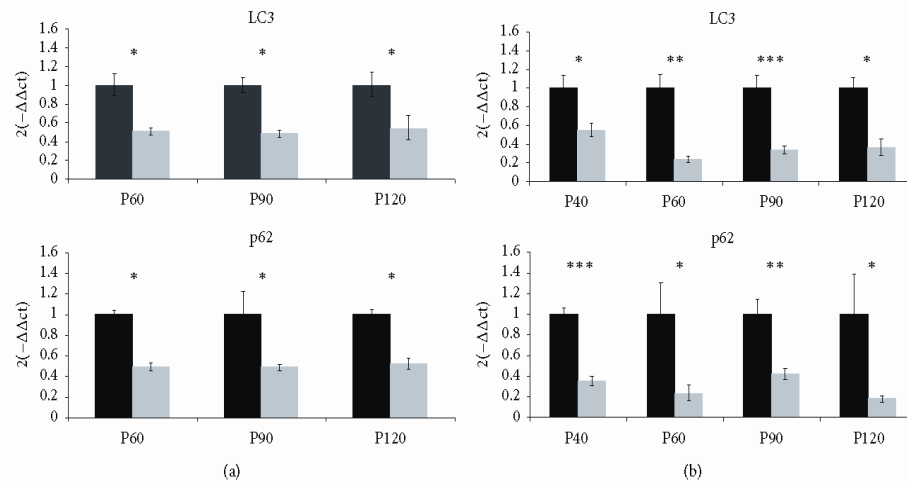


FIGURE 1: LC3 and p62 mRNA expression in the spinal cord and the skeletal muscle. (a) The transcript levels in the spinal cord of males (black bars) and females (grey bars) from mice at P60, P90, and P120 are shown. Relative expression values are females compared with males (set at 1) at each age. (b) The transcript levels in skeletal muscles of male (black bars) and female (grey bars) mice at P40, P60, P90, and P120 are shown as in (a). Each data point represents the mean \pm SEM of twelve mice. Asterisks denote a student *t*-test *p* value <0.05 (*), <0.01 (**), and <0.001 (***).

2. Material and Methods

2.1. Mice. From each sex, twelve wild type mice (B6SJL) at postnatal (P) days 40, 60, 90, and 120 were used in the study. These selected ages corresponded to the progression of the sexual maturation of the animals and therefore this study could be carried out to follow accurately this progression. The Ethic Committee for Animal Experiments of the University of Zaragoza approved all experimental procedures. Animal care and experimentation were performed accordingly with the Spanish Policy for Animal Protection RD53/2013, which meets the European Union Directive 2010/63/UE on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. Food and water were available *ad libitum*. The mice were sacrificed by CO₂ anaesthesia. Spinal cord and skeletal muscle were dissected, snap-frozen, and preserved at -80°C .

2.2. Real-Time-PCR. For RNA extraction, spinal cord and skeletal muscle tissue were pulverized in liquid nitrogen with a cell crusher using Trizol Reagent (Invitrogen). RNA was treated with Turbo DNA-free kit (Ambion) to eliminate genomic DNA. Reverse transcription was carried out according to the SuperScript First-Strand Synthesis System kit (Invitrogen). Gene expression was assayed by real-time PCR. Primer and probe mixture for LC-3 (Map1lc3a, Mm00458724_m1) and p62 (Sqstm1, Mm00448091_m1) were supplied by Applied Biosystems. Two endogenous genes (GAPDH: 4352932E and β -actin: 4352933E, Applied Biosystems) were used for normalization of the data [11]. Target gene expression was normalized using the geometric mean of these two housekeeping genes and relative gene expression was determined using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [12, 13]. All

reactions were performed in triplicate and the primer/probe efficiencies of sets were close to 100%.

2.3. Western Blot. Powdered tissue was homogenized in RIPA lyses buffer with protease inhibitors (Complete, Roche); the homogenate was centrifuged at $10000 \times g$ for 10 min at 4°C and the resulting supernatants were collected. Protein concentration was determined by BCA method (Sigma-Aldrich). Forty micrograms of total protein was subjected to SDS/PAGE and transferred to PVDF membranes (Amersham Biosciences). Membranes were incubated in blocking solution overnight at 4°C and then incubated one hour with primary antibodies against LC-3 (1:1000, MBL), p62/SQSTM1 (1:1000, Enzo Life Sciences), and GAPDH (1:1000, Santa Cruz). After incubation with HRP-conjugated secondary antibodies (Santa Cruz), bands were visualized by enhanced chemiluminescent reagent (GE Healthcare Life Science). Immunoblots were exposed and scanned and densitometry was measured with AlphaEaseFC software (Biosai).

2.4. Statistical Analysis. Different groups were compared using Student's *t*-test. This statistical analysis was carried out in SPSS version 19.0 software (IBM). The data are presented as means, and error bars represent the standard error of the mean (SEM). Significance was set at a *p* value of less than 0.05.

3. Results

3.1. RT-PCR in Muscle and Spinal Cord Tissue. At the transcriptional level in spinal cord tissue (Figure 1(a)), LC3 expression levels were generally lower in females than in

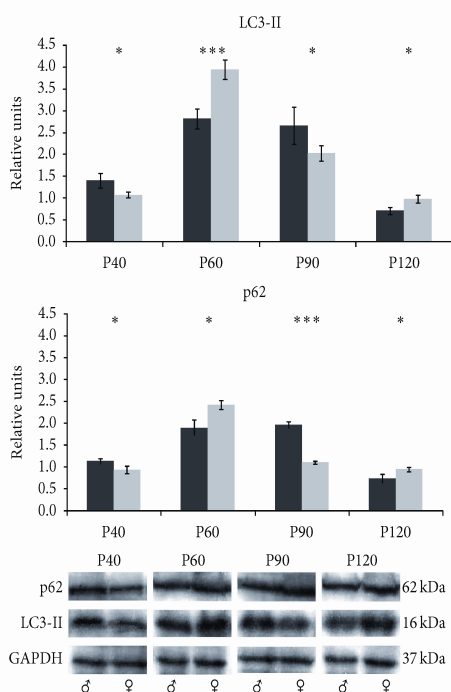


FIGURE 2: LC3-II and p62 protein expression in the spinal cord. Western blot for LC3-II and p62 proteins in spinal cord tissue from male (black bars) and female (grey bars) mice and its quantitative analysis relative to GAPDH. The representative blots for each age, sex, and protein are shown at the bottom. Data show mean \pm SEM of twelve mice. p value <0.05 (*) and <0.001 (***)

males, and statistical differences were found at P60, P90, and P120 ($*p < 0.05$). p62 mRNA expression levels in females were lower than in males at all studied ages ($*p < 0.05$). Notably, the expression of both genes maintained constant proportional levels between the sexes at all different ages. In skeletal muscle tissue (Figure 1(b)), the mRNA expression pattern was similar to the one observed in spinal cord. In the case of LC-3 transcripts, females showed less LC-3 expression levels than males. The differences between the sexes were significant at each studied age, although the most significant difference was detected at P90 ($***p < 0.001$) and P60 ($**p < 0.01$). Also, the p62 gene expression was significantly decreased in females at all ages, and the most significant difference between sexes was at P40 ($***p < 0.001$) and P90 ($**p < 0.01$).

3.2. Western Blot in Spinal Cord Tissue. The immunoblot analysis of spinal cord extracts revealed that LC3-II and p62 protein levels in females increased until P60 and later decreased gradually until P120 (Figure 2). In males, the LC3-II highest expression levels were reached at P60 and the most significant differences between males and females were

detected at this age ($***p < 0.001$). At P40 and P90, LC3-II expression levels were significantly lower in females ($*p < 0.05$). Moreover, at P60, LC3-II, and p62 protein levels in females reached the maximum levels and significant differences between males and females were detected ($***p < 0.001$ and $*p < 0.05$, resp.). The males showed the highest expression levels of p62 at P90 and, in case of p62 protein, the males even doubled the expression levels of females ($***p < 0.001$).

3.3. Western Blot in Skeletal Muscle Tissue. Interestingly, LC3 western blot analysis of skeletal muscle tissue revealed two bands corresponding to LC3-I and the activated form, LC3-II (18 and 16 kDa, resp.) (Figure 3). The expression of LC3-II in males increased until P90, although it was similar along the studied ages. In females, the highest LC3-II expression was at P40 and significant differences between males and females were detected at P40 and P60 ($***p < 0.001$ and $*p < 0.05$, resp.). LC3-I was not detectable in all the replicate samples and its expression was quite variable. At P60 and P120, females showed lower LC3-I levels than males ($*p < 0.05$ and $***p < 0.001$, resp.). The expression of p62 was not affected by sex at P40, P60, and P120. However, at P90, females showed higher expression levels than males ($*p < 0.05$).

4. Discussion

Experimental studies have demonstrated sex-dependent physiological, morphological, and hormonal differences, and therefore the capability of biological response can be different in both sexes [14]. A number of studies have confirmed sexual dimorphism under pathological and various physiological conditions, underlining the need to include both sexes in the experimental groups. The inclusion of female sex in basic research and clinical trials, such as drug trials, has been essential to reveal potentially different responses and minimize the possibility of adverse sex-dependent effects [15].

This issue was particularly relevant in the case of diseases, in which gender had already been shown to modify the associated pathology, the age of onset, disease progression, or the efficiency of the treatment [16]. Many diseases have been associated with alterations in autophagy and consequently some gender-associated differences have already been demonstrated [16]. For instance, in neurodegenerative disorders, estrogen was neuroprotective and enhanced neurotrophic/synaptic plasticity [17]. In vascular biology, compelling data indicated that sex differences were not only determined by sex steroid levels but may also be modified by innate cellular differences between males and females [18].

Regarding autophagy, only few studies allow for the possible influence of sex-dependence in this molecular process. One of the studies proposed the autophagy as a survival mechanism in males, whereas in female's autophagy resulted in detachment-derived cell death [11]. In accordance with these studies, it has been reported recently that sex differences in constitutive autophagy was found in rats and, moreover,

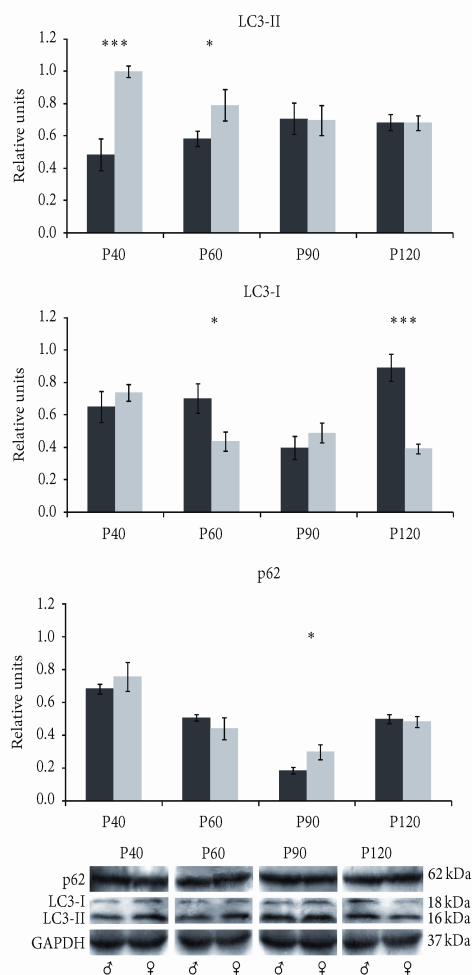


FIGURE 3: LC3-II and p62 protein expression in the skeletal muscle. Western blot for LC3-II, LC3-I, and p62 proteins in muscle tissue from male (black bars) and female (grey bars) mice and its quantitative analysis relative to GAPDH. Data show mean \pm SEM of twelve mice. *p* value <0.05 (*) and <0.001 (***).

this sexual dimorphism was organ specific [9]. Furthermore, *in vitro* studies also showed a sexual dimorphism in autophagic processes in cancer [12, 13] and in neurons under starvation [4].

Taking into consideration these reported findings, in the present study, differences in constitutive autophagy between males and females of wild type mice are shown. Since the selected ages of the animals in this study have been accurately studied to follow their maturation progress in physiological conditions, in which no influence of disease takes place, the different features displayed by both sexes in this study could be mainly due to hormonal regulators, as previously

suggested by Maselli et al. [19]. Significant differences of LC3 and p62 transcriptional expression levels in spinal cord and skeletal muscle tissues during sexual maturation of the animals have been observed. Furthermore, these differences appeared also at protein levels, in particular at P60 and P90 in spinal cord, in which sexual maturation was completed and at the early stages of maturation process in skeletal muscle. Moreover a different pattern of expression in spinal cord and muscle and, only in the case of muscle tissue, LC3-I protein levels (inactive form of LC3) were detected. Accordingly with previous studies [9], this result suggested a tissue-dependent modulation mechanism of autophagy under physiological conditions.

5. Conclusions

We conclude that sex and tissue specific differences exist in physiological autophagy from juvenile to young mice. Therefore, a better knowledge of the wild type mice profile pattern is needed to guarantee a correct interpretation of the results. These results have special importance as they suggest that the sex must be taken into account in the experimental design in order to minimize potential adverse consequences of sex bias.

Conflict of Interests

The authors declare that they have no conflict of interests.

Acknowledgments

The authors would like to thank Silvia Garcés, Pilar Lierta, and Miriam de la Torre for their expert technical assistance. They also thank Dr. Patricia Boya for her helpful assistance. This work was supported by Grants PI10/0178 from Fondo de Investigación Sanitaria of Spain, no. 554406 from ALS Association, and INNPACTO IPT-2011-1091-900000 Ministerio de Ciencia e Innovación.

References

- [1] A. K. Beery and I. Zucker, "Sex bias in neuroscience and biomedical research," *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, vol. 35, no. 3, pp. 565–572, 2011.
- [2] N. Mizushima and M. Komatsu, "Autophagy: renovation of cells and tissues," *Cell*, vol. 147, no. 4, pp. 728–741, 2011.
- [3] M. Komatsu, S. Waguri, T. Chiba et al., "Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice," *Nature*, vol. 441, no. 7095, pp. 880–884, 2006.
- [4] T. Hara, K. Nakamura, M. Matsui et al., "Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice," *Nature*, vol. 441, no. 7095, pp. 885–889, 2006.
- [5] M. Komatsu, T. Ueno, S. Waguri, Y. Uchiyama, E. Kominami, and K. Tanaka, "Constitutive autophagy: vital role in clearance of unfavorable proteins in neurons," *Cell Death and Differentiation*, vol. 14, no. 5, pp. 887–894, 2007.
- [6] L. Du, R. W. Hickey, H. Bayir et al., "Starving neurons show sex difference in autophagy," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 284, no. 4, pp. 2383–2396, 2009.

5.2 MANUSCRITO 2



Time-point dependent activation of autophagy and the UPS in muscle of SOD1G93A mice.

Oliván S, Calvo AC, Gasco S, Muñoz MJ, Zaragoza P, Osta R

Enviado a Cell Death and Disease

ABSTRACT

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a fatal neurodegenerative disease characterized by a selective loss of motor neurons together with a progressive muscle weakness. Albeit the pathophysiological mechanisms of the disease remain unknown, growing evidence suggests that skeletal muscle can be a target of ALS toxicity. In particular, the two main intracellular degradation mechanisms, autophagy and the ubiquitin-proteasome degradative system (UPS) have been poorly studied in this tissue. In this study we investigated the time-point dependent activation of autophagy and the UPS in the skeletal muscle from transgenic SOD1G93A mice, a mouse model for the disease, along disease progression. Our results showed a significant upregulation of proteasome activity at early symptomatic stage, while the autophagy activation was found at terminal stages, since chloroquine treatment revealed the upregulated levels of LC3-II and p62 found at late stages were indicative of an autophagy activation. The mRNA upregulated levels of *LC3*, *p62*, *Beclin1*, *Atg5* and *E2f1* were only observed at symptomatic and terminal stages, which reinforced the time-point activation of autophagy. Furthermore, no apoptosis activation was observed along disease progression. The combined data provided clear evidence for the first time that proteasome impairment triggered autophagy at late stages of the disease in the skeletal muscle from transgenic SOD1G93A mice. These findings could represent a new approach for potential therapeutic treatments.

Keywords: ALS, autophagy, LC3, skeletal muscle, transgenic SOD1G93A mice, UPS

Abbreviations: ALS, Amyotrophic Lateral Sclerosis; CQ, chloroquine; ER, endoplasmic reticulum; fALS, familial ALS; LC3, microtubule-associated protein 1 light chain; P, postnatal day; PBS, phosphate-buffered saline; SEM, standard error of the mean; UPR, unfolded protein response; UPS, ubiquitin-proteasome degradative system.

INTRODUCTION

Autophagy and the ubiquitin-proteasome degradative system (UPS) are considered two main critical mechanisms that contribute to basal elimination of misfolded proteins and hence, they maintain the balancing protein homeostasis inside cells. Albeit autophagy was initially described as a central mechanism for cell survival under starvation conditions, a growing number of studies indicate that autophagy can play a relevant role in eliminating protein aggregates, especially in neurodegenerative diseases, mainly because its activation can efficiently degrade misfolded mutant proteins.¹ For this reason, autophagy markers are becoming the new targets for potential therapeutic strategies in neurodegenerative diseases, such as Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS).

ALS is one of the most known neurodegenerative diseases characterized by a selective loss of motor neurons together with a progressive muscle weakness. The first studies that connected an impairment in autophagy to the progression of ALS showed a significant upregulation of the activated microtubule-associated protein 1 light chain (LC3) protein levels at the end symptomatic stage in the spinal cord from SOD1G93A mice, one of the best characterized animal models of the disease.^{2,3} At this step, macroautophagy, an intracellular process that leads to the elimination of cytoplasmic components inside lysosomes, was proposed as the main process that degraded mutant SOD1 *in vitro* and *in vivo* in the spinal cord from SOD1G93A mice.⁴ Remarkably, a wide range of studies have characterized till now the possible cause of autophagy impairment in different experimental models for ALS.⁵⁻¹³ In addition, mutant SOD1 aggregates not only induce impairment in proteasome activity but also alterations in SOD1 intracellular distribution.¹⁴ In particular, there is clear evidence that endoplasmic reticulum (ER) stress correlates directly to motor neuron loss and ALS progression and interestingly, the adaptative responses to ER stress through protein folding pathways, such as unfolded protein response (UPR) are also closely related to macroautophagy in mutant SOD1 transgenic mice.^{7,8} The UPR is the main protective mechanism during ER stress and it promotes either protein folding or degradation of misfolded proteins. Precisely, the UPS is an important mechanism for the degradation of misfolded proteins exporting from ER and its failure can lead to significant ER stress.^{7,15-17}

In this complex scenario and taking into consideration that the main cause of ALS disease remains unknown, the need for studying autophagy not as a single process but just in connection with other related processes such as the UPS, becomes relevant to a better understanding of the molecular basis of ALS. It is worth noting that both macroautophagy and proteasome were proposed as essential mechanisms for the reduction of mutant SOD1-mediated neurotoxicity in familial ALS (fALS), the genetic form of the disease.^{5,18} However, little information has been reported regarding autophagy and proteasome activity in one of the most affected tissues of the disease, the skeletal muscle, which is a more accessible tissue than spinal cord or brain in potential therapeutic strategies. Actually, muscle weakness has been described as one of the major causes of disability in ALS and for this reason the better understanding of the way ALS can affect skeletal muscle function becomes essential.

As a matter of fact, previous studies have characterized the skeletal muscle as a primary target of mutant SOD1 toxicity and the need for modulation of autophagy as a potential therapeutic intervention to counteract muscle atrophy has been also proposed.^{9,19,20} Recent data reported that mutant SOD1 clearance was higher in muscles than in motorneurons. Taking into consideration that proteasome impairment has been shown to trigger autophagy, in this study, we investigated the role of autophagy in skeletal muscle tissue from SOD1G93A mice along disease progression and in connection with the UPS. Our results revealed a novel finding about the time-point dependent activation of autophagy and the UPS in this tissue, paving the way to potential therapeutic strategies for the disease.

RESULTS

Activation of autophagy at the late stages of the disease. To characterize the autophagy machinery in transgenic SOD1G93A mice along disease progression, the mRNA levels of the *Lc3*, *p62*, *Beclin1*, *Atg5* and *E2f1* genes were first quantified by real-time PCR in the skeletal muscle tissue of wild type and transgenic SOD1G93A mice at postnatal days (P) P40, P60, P90 and P120. At symptomatic and terminal stages of the disease (P90 and P120) all the analyzed

transcripts were significantly upregulated. At early symptomatic stage (P60), mRNA levels of *Beclin1* and *Atg5* were significantly downregulated in transgenic SOD1G93A mice, while upregulated levels were found in the case of *E2f1* (Figure 1).

Moreover, we analyzed the protein expression of two widely used autophagy markers, LC3-II and p62 along disease progression. We found that the expression levels of both proteins remained almost unchanged until P90. A statistically significant downregulation of p62 levels were observed at P40, while a significant impairment was found in LC3-I levels at the first stages of the disease. However, at the terminal stage of the disease (P120), a significant upregulation was found in LC3-I, LC3-II and p62 (Figure 2a). This upregulation of LC3-II and p62 levels at P120 could point out to an activation of autophagy process or just its blockage. Therefore, in order to shed light on this question, we next assessed the autophagic flux at P120. At this point, skeletal muscle samples from transgenic SOD1G93A mice were treated with chloroquine, an agent that impairs lysosomal acidification. The results showed an accumulation of LC3-II in all the tested samples, so this would indicate that the upregulated levels of LC3-II and p62 were a consequence of an enhancement of the autophagic flux (Figure 2b).²¹

Activation of proteasomal activity at early symptomatic stages. Proteasome activation is the primary pathway by which proteins are cleared from cells.²² Given the late activation of autophagy in transgenic SOD1G93A mice, we further investigated whether autophagy impairment influenced proteasomal activation at early stages. For these purpose, we measured the activity of the 20S proteolytic component of the 26S proteasome. In transgenic SOD1G93A mice, the proteasomal activity was significantly reduced at P40, P90 and P120, while at P60 the proteasome was significantly activated (Figure 3). These results suggested an impairment in proteasome function in the skeletal muscle of transgenic SOD1G93A mice in the main stages of the disease and the activation peak at P60 could imply a time-dependent way of action in the proteasomal degradation.

Absence of apoptosis activation in muscle tissue. To further study in depth the role of the time-dependent activation of autophagy and proteasome in the

disease, we determined the role of apoptosis in the progression of the disease. Western blot analysis for the total and the cleaved form of caspase-3, Bax and Bcl2 profile expression pattern was performed. The caspase-3 has been described as the final effector of the apoptotic cell death mechanism, while Bax and Bcl2 have been defined as pro and anti-apoptotic proteins respectively. Interestingly, no significant differences were detected between caspase-3 levels from wild type and SOD1G93A mice (data not shown). However, the highest procaspase-3 expression levels were found at P90 and P120 ($p > 0.001$). Moreover, the activity of Bcl-2 decreased significantly at P40 and increased significantly at the terminal stage, P120 ($p < 0.05$) (Figure 4). These data suggested that apoptosis was not exerting a decisive role in the skeletal muscle tissue from transgenic SOD1G93A mice. In addition, to verify the western blot results, the apoptosis was visualized by TUNEL assay. As shown in Figure 5, the percentage of TUNEL positive cells was very low at any stage of the disease (less than 1%) in all the tested samples from wild type or SOD1G93A mice. Moreover, not significant differences were detected between wild type and SOD1G93A mice, supporting the fact that the apoptotic cell death was not happening in the skeletal muscle from SOD1G93A mice along disease progression.

DISCUSSION

Skeletal muscle is one of the target tissues dramatically affected by the degenerative progression of ALS. Actually, this tissue plays an important role in the neurophysiologic diagnosis of the disease and therefore it may be considered a primary target of ALS toxicity.²³⁻²⁵

The role of autophagy in transgenic SOD1G93A mice was just described as one of the major intracellular mechanism involved in muscle atrophy.²⁶ The oxidative stress induced in this animal model is sufficient to activate autophagy. Interestingly, in MLC/SOD1G93A mice, in which the overexpression of mutated SOD1 is restricted to skeletal muscle, the siRNA inactivation of LC3, an essential marker for autophagosome formation, led to the rescue of the muscle phenotype.²⁶ Furthermore, not only autophagy but also the ubiquitin-proteasome

degradative system (UPS) is more markedly induced in muscle cells than in motor neurons.^{27,28}

In this study, we further investigated the close link between autophagy and the UPS and the interplay between these mechanisms and apoptosis that could explain the induction of muscle atrophy in transgenic SOD1G93A mice. To this purpose, we first evaluated the mRNA levels of five well-known markers of autophagy, *LC3*, *p62*, *Beclin1*, *Atg5* and *E2f1*. At asymptomatic stage (P40) no significant changes were found. However, statistically significant upregulated levels were found in all of these autophagic markers at symptomatic and terminal stages (P90 and P120) in transgenic SOD1G93A mice, while at early symptomatic stage (P60), *Beclin1* and *Atg5* levels significantly decreased and *E2f1* levels increased in transgenic SOD1G93A mice with respect to wild type mice. *Beclin1*, *Atg5* and *E2f1* are components of the autophagy initiation complex; therefore, the *Beclin1* and *Atg5* deregulation at the early symptomatic stage suggested an autophagy inhibition in this time point in spite of the upregulated *E2f1* levels. In particular, *Beclin1* plays a relevant role in the regulation and induction of a correct autophagy flux in muscle during fasting and precisely, a muscle specific inactivation of *Atg5* gene determines a severe muscle wasting in mice.²⁹ Therefore, the downregulation of these two markers at early symptomatic stage pointed out to an insufficient autophagy, being detrimental for muscle homeostasis. Moreover, transcriptional activity of *E2f1* plays an important role in the induction of autophagy. Moreover, it has been described that *E2f1* and its truncated form *E2f1tr*, lacking the transactivation domain, can upregulate the expression levels of autophagic genes such as *LC3* and *Atg5*.^{30,31} In spite of the well described role of *E2f1* in the modulation of both apoptosis and autophagy, mainly in melanoma and embryonic cell lines, the upregulated levels of *E2f1* found in the skeletal muscle from transgenic SOD1G93A mice at early symptomatic stage could not be sufficient enough to prompt the activation of *LC3* and, above all, *Beclin1* and *Atg5*.

Following with the autophagic response in skeletal muscle, we next examined the protein expression levels of the two main markers of the autophagic flux, *LC3*, which is associated with the autophagosome when the autophagy is activated, and *p62*, which plays an important role in the insertion of ubiquitinated misfolded proteins into the autophagosomes. Albeit no significant differences were found

at symptomatic stage, in accordance with mRNA profile expression pattern at terminal stage, upregulated levels were observed in LC3-II, LC3-I and p62 in transgenic SOD1G93A mice with respect to wild type mice. However, deregulated levels of LC3-I were only found at earlier stages, suggesting that autophagy was mainly activated at later stages. To study in depth the LC3-II and p62 upregulation found at terminal stage and to determine if this upregulation was a consequence of a blockage or an acute activation of autophagy, we blocked the activity of acidic degradative compartments using chloroquine in transgenic SOD1G93A mice at terminal stage, P120. Chloroquine is an inhibitor of endosomal acidification that mainly accumulates inside endosomes and lysosomes, prompting the inhibition of lysosomal enzymes and preventing the fusion of these two organelles. It is commonly used as an inhibitor of autophagy process since it blocks the fusion of autophagosomes and lysosomes and therefore it inhibits the lysosomal protein degradation. The inhibitory action of chloroquine has been previously tested in *in vitro* models of ALS, but to date no data has been registered in skeletal muscle cells.³² After treating with chloroquine the explants from skeletal muscles, significant LC3-II increased levels were observed in transgenic SOD1G93A mice with respect to wild type mice at terminal stage, suggesting that autophagy was still activated. As a consequence, the upregulation of LC3-II and p62 at P120 indicated a significant activation of autophagy at this terminal stage. These data are consistent with previous studies in the same tissue, in which mRNA and protein levels of LC3 and p62 were found significantly increased in transgenic SOD1G93A and in MLC/SOD1G93A mice at later stages of the disease, suggesting that muscle cells were still able to upregulate these two essential markers of autophagy.^{26,28}

The next question that arose to us was the study of the mechanisms that could be in clear connection with autophagy to manage the degenerative progression of the disease in skeletal muscle cells at earlier stages. The interplay between autophagy and the UPS seems to be close enough to finely remove the intracellular accumulation of mutant SOD1 aggregates.¹⁵ Actually, p62 participates in both mechanisms to eliminate ubiquitinated proteins from cells. At this step and taking into consideration the significant autophagy activation at the terminal stage, we wonder if the proteasome activation could start earlier than autophagy in the skeletal muscle from transgenic SOD1G93A mice. Previous

studies in this animal model showed that soluble mutant SOD1 in skeletal muscle did not have direct effects on mitochondrial dysfunction, protein misfolding and muscle loss.^{28,33} However, the expression of mutant SOD1 in this tissue induced atrophy and mitochondrial abnormalities, favouring proteasome degradation under proteotoxic conditions, such as misfolded mutant SOD1 overexpression.^{28,34} In accordance with these studies, our results showed an impairment in proteasome activity along disease progression. In particular, a significant upregulation of proteasome activity was only found at early symptomatic stage, P60, while a significant downregulation was registered at asymptomatic, symptomatic and terminal stages in transgenic SOD1G93A mice with respect to wild type mice. These results suggested that the proteasome degradation was only activated at early symptomatic stage and even earlier than autophagy activation in skeletal muscle tissue.

Finally, with regards to the possible apoptosis induction in skeletal muscle, we studied the protein levels of procaspase-3, caspase-3, Bcl-2 and Bax in transgenic SOD1G93A mice. No significant differences were found in caspase-3 protein levels in transgenic SOD1G93A mice with respect to wild type mice, while significant upregulated levels were observed in procaspase-3 at symptomatic and terminal stages (P90, P120). In relation to Bcl-2 and Bax, only in the case of Bcl-2, deregulated levels of Bcl-2 were observed at asymptomatic and terminal stages. These results suggested that apoptosis might not be triggered along disease progression in the skeletal muscle from transgenic SOD1G93A mice. To verify these results and taking into consideration previous studies *in vitro* in which autophagy protected muscle cells after chemical and physical stimuli,³⁵ we performed a TUNEL analysis to study more accurately the apoptosis activation. Interestingly and contrary to previous studies that revealed caspase-mediated apoptosis at paralysis stage,³⁶ no significant differences were detected between wild type and transgenic SOD1G93A mice, reinforcing the fact that apoptosis was not activated in any studied stage of the disease. These results were in accordance with a previous study in a mouse model that lacked the antioxidant enzyme Sod1 (*Sod1*^{-/-} mice). The chronic oxidative stress induced in this animal model exacerbated muscle atrophy, leading to the activation of mitochondrial-mediated myonuclear apoptosis.³⁷ However, in the skeletal muscle from transgenic SOD1G93A mice no apoptosis activation was found, pointing out to

the fact that mutant SOD1 was not directly influencing mitochondrial dysfunction as previously reported.^{28,33} Furthermore, in connection with this result it is interesting to note that rapamycin, an autophagy enhancer, accelerated the motor neuron degeneration in transgenic SOD1G93A mice and it exacerbated the pathological progression mainly through apoptosis, suggesting that specific stimuli could possibly trigger the tissue degeneration through apoptosis.³⁸

The data presented here uncover for the first time that there is a cross-talk between autophagy and the UPS in the skeletal muscle from transgenic SOD1G93A mice. It has been described their compensatory way of action, in other words, the autophagy activation is prompted when the UPS impairment is present, and therefore autophagy blockage directly influences the UPS function.³⁹ Based on the fact that a failure of the UPS function is relevant in the neurodegenerative progression in motor neuron diseases, our results are in line with this point, since the activation of proteasome activity was only relevant at early symptomatic stage and this activation was followed by the autophagy activation at symptomatic and terminal stages. Taking into consideration that in skeletal muscle, in contrast to other tissues, the activation of autophagy can persist for long periods of time, the transient activation of autophagy at late stages in transgenic SOD1G93A mice could suggest a deregulation of this process along disease progression due to the degeneration related to ALS. These findings provide new insights into the role of autophagy in the progression of ALS, although further studies are required to completely unravel unknown features of this protein degradation mechanism and its close relation to the UPS. Consequently, a possible progress in the design of promising therapeutic interventions could be addressed.

MATERIALS AND METHODS

Animals. Transgenic mice expressing the G93A mutant human SOD1 were originally obtained from The Jackson Laboratory (B6SJLTg(SOD1*G93A)1Gur/J). Hemizygotic transgenic mice were obtained by mating transgenic males with F1 females (B6SJL). The offspring were identified by PCR amplification of DNA extracted from tail tissue with specific primers for human SOD1. Wild type littermates were used as controls for all experiments. Hemizygous SOD1G93A

mice at the following days of life were used: 40 (presymptomatic, P40), 60 (early symptomatic, P60), 90 (symptomatic, P90) and 120 (terminal stage, P120). The animals were housed in the Unidad Mixta de Investigación of the University of Zaragoza under a 12h light/dark cycle. Food and water were available *ad libitum*. The care and use of animals were performed accordingly with the Spanish Policy for Animal Protection RD53/2013, which meets the European Union Directive 2010/63/UE on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes.

The mice were sacrificed by CO₂ anesthesia and skeletal muscles from both hindlimbs were dissected, snap-frozen and preserved at -80°C. Muscle tissue from each group of mice was pulverized in liquid nitrogen with a cell crusher. The powdered tissue was divided equally for RNA and protein extraction. All experimental groups were balanced to avoid sex bias.⁴⁰

mRNA expression. For RNA extraction, powdered muscle tissue was homogenized with Trizol Reagent (Invitrogen) (n=10 animals per time point and genotype) using a PRO200 homogenizer (PRO Scientific Inc.). RNA extracted was treated to eliminate genomic DNA using the Turbo DNA-free™ kit (Ambion). Reverse transcription was carried out according to the SuperScript™ First-Strand Synthesis System kit (Invitrogen). Gene expression variations in all of the samples were assayed by real-time PCR in an ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Primer and probe mixtures for each gene LC3 (Mm00458724_m1) and p62 (Mm00448091_m1) were supplied by Applied Biosystems. Two endogenous genes (GAPDH and β-actin, Applied Biosystems) were used for normalization of the data.^{41,42} All reactions were performed in triplicate and the reaction efficiencies of the primer/probe sets were close to 100%.

Western blot analysis. The powdered skeletal muscle tissue (n=12 animals per time point and genotype) was resuspended in RIPA lysis buffer with protease inhibitors (Complete, Roche) and the homogenate were centrifuged at 10.000 g for 10 min at 4°C. The supernatants were collected and the protein concentration was quantified by BCA method (Sigma-Aldrich). Forty micrograms of protein was resolved on a 15% SDS-page gel and the proteins were transferred

to PVDF membranes (Amersham Biosciences). The membranes were blocked in Tris-buffered saline supplemented with 0.1% Tween 20 and 5% (w/v) powdered skim milk overnight at 4°C and then incubated with primary antibodies for one hour against LC3 (1:1000, MBL), p62/SQSTM1 (1:1000, Enzo Life Sciences), Caspase-3 (1:500, Cell Signalling), Bax (1:1000, Santa Cruz), Bcl2 (1:1000, Santa Cruz) and GAPDH (1:1000, Santa Cruz). After incubation with HRP-conjugated secondary antibodies, bands were visualized by ECL (GE Healthcare Life Science). Immunoblots were scanned and densitometry was measured with AlphaEase FC software (Bonsai).

Proteasome activity. Skeletal muscle tissue was homogenized in cold buffer (20 mM TrisHCl pH 7.5, 2 mM EDTA) and centrifuged at 15000 g for 10 min at 4°C (n=6 animals per time point and genotype). Protein concentration in supernatants was determined using the BCA protein assay. All samples were assayed in triplicate using 10 µg of freshly protein extracts. Proteasome activity was measured using the CHEMICON® Proteasome Activity Assay Kit (APT280, Millipore) as described by the manufacturer. The extracts were incubated (2h at 37°C) with a labeled substrate, LLVY-7-amino-4-methylcoumarin, and the cleavage activity was monitored by detection of the free fluorophore 7-amino-4-methylcoumarin using a fluorescence plate reader (Infinite F200 PRO, TECAN) at 360/460 nm.

In vitro assay. Skeletal muscle tissue (P120, n=6 animals per time point and genotype) were dissected and the tissue was then chopped into small pieces. The explants were rinsed in phosphate-buffered saline (PBS) prior to being cultured in DMEM containing 10 % (v/v) fetal bovine serum and 100 µM chloroquine (Sigma) for 6 hours at 37°C and 5% CO₂. After culture, the explants were washed twice with PBS, snap-frozen and preserved at -80°C.

Apoptotic detection. Skeletal muscle tissue was removed, fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 24 hours and cryopreserved in 30% sucrose for 48 hours. Sample tissues were embedded in Tissue-Tek frozen tissue embedding medium and frozen in liquid nitrogen-cooled 2-methylbutane. The tissue blocks were stored at -80°C. Transverse sections (10 µm) were cut with using a cryostat (CM1510S Leica Microsystems). Detection of apoptotic nuclei was assessed by

TUNEL assay (Terminal deoxynucleotidyl transferase fluorescein-dUTP nick end-labelling) using the In situ Cell Death Detection kit (Roche). The positive controls were carried out on serial sections after prior incubation with DNase I, while negative control used label solution instead of TUNEL reaction mixture. At the end of the assay, the slides were mounted with Vectashield with DAPI (Vector laboratories). The percentage of apoptotic cells was determined by counting TUNEL-positive cells on an Olympus IX81 microscope.

Statistical analysis. Statistical analyses were carried out using T-Student test. All of the values were expressed as means and error bars represent standard error of the mean (SEM). The statistical significance threshold was set at $p < 0.05$. The software used for the statistical analysis was SPSS 19.0 (IBM).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Miriam de la Torre, Silvia Garcés and Pilar Lierta for their expert technical assistance. They also thank Dr. Patricia Boya and Dr. Victor Sorribas for their helpful assistance. This work was supported by Grants PI10/0178 from Fondo de Investigación Sanitaria of Spain and INNPACTO IPT-2011-1091-900000 Ministerio de Ciencia e Innovación.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

RO supervised all experiments. SO and ACC wrote the manuscript. SO and SG performed the experiments. PZ and MJM provided helpful discussions and helped in the revision of the manuscript.

REFERENCES

1. Nassif M, Hetz C. Targeting autophagy in ALS. *Autophagy* 2011; **7**: 450-453.
2. Morimoto N, Nagai M, Ohta Y, Miyazaki K, Kurata T, Morimoto M, et al. Increased autophagy in transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. *Brain Res.* 2007; **1167**: 112-117.
3. Tian F, Morimoto N, Liu W, Ohta Y, Deguchi K, Miyazaki K, et al. In vivo optical imaging of motor neuron autophagy in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Autophagy* 2011; **7**: 985-992.
4. Li L, Zhang X, Le W. Altered macroautophagy in the spinal cord of SOD1 mutant mice. *Autophagy* 2008; **4**: 290-293.
5. Kabuta T, Suzuki Y, Wada K. Degradation of Amyotrophic Lateral Sclerosis-linked Mutant Cu,Zn-Superoxide Dismutase Proteins by Macroautophagy and the Proteasome. *J. Biol. Chem.* 2006; **281**: 30524-30533.
6. Winslow AR, Rubinsztein DC. Autophagy in neurodegeneration and development. *Biochim. Biophys. Acta* 2008; **1782**: 723-729.
7. Hetz C, Thielen P, Matus S, Nassif M, Court F, Kiffin R, et al. XBP-1 deficiency in the nervous system protects against amyotrophic lateral sclerosis by increasing autophagy. *Genes Dev.* 2009; **23**: 2294-2306.
8. Madeo F, Eisenberg T, Kroemer G. Autophagy for the avoidance of neurodegeneration. *Genes Dev.* 2009; **23**: 2253-2259.
9. Onesto E, Rusmini P, Crippa V, Ferri N, Zito A, Galbiati M, et al. Muscle cells and motoneurons differentially remove mutant SOD1 causing familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* 2011; **118**: 266-280.
10. Mori A, Yamashita S, Uchino K, Suga T, Ikeda T, Takamatsu K, et al. Derlin-1 overexpression ameliorates mutant SOD1-induced endoplasmic reticulum stress by reducing mutant SOD1 accumulation. *Neurochem. Internat.* 2011; **58**: 344-353.
11. Ferrucci M, Fulceri F, Toti L, Soldani P, Siciliano G, Paparelli A, et al. Protein clearing pathways in ALS. *Arch. Ital. Biol.* 2011; **149**: 121-149.
12. Otomo A, Pan L, Hadano S. Dysregulation of the Autophagy-Endolysosomal System in Amyotrophic Lateral Sclerosis and Related Motor Neuron Diseases. *Neurol. Res. Int.* 2012; **2012**: 498428, doi:10.1155/2012/498428.
13. Dasuri K, Zhang L, Keller JN. Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis. *Free Rad. Biol. Med.* 2013; **62**: 170-185.
14. Sau D, De Biasi S, Vitellaro-Zuccarello L, Riso P, Guarnieri S, Porrini M, et al. Mutation of SOD1 Mutation of SOD1 in ALS: a gain of a loss of function. *Human Mol. Genet.* 2007; **16**: 1604-1618.
15. Ding WX, Ni HM, Gao W, Yoshimori T, Stolz DB, Ron D, et al. Linking of autophagy to ubiquitin-proteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability. *Am. J. Pathol.* 2007; **171**: 513-524.
16. Pandey UB, Nie Z, Batlevi Y, McCray BA, Ritson GP, Nedelsky NB, et al. HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS. *Nature* 2007; **447**: 859-863.
17. Kaganovich D, Kopito R, Frydman J. Misfolded proteins partition between two distinct quality control compartments. *Nature* 2008; **454**: 1088-1095.
18. Kabashi E, Agar JN, Hong Y, Taylor DM, Minotti S, Figlewicz DA, et al. Proteasomes remain intact, but show early focal alteration in their

- composition in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* 2008; **105**: 2353-2366.
19. Dobrowolny G, Aucello M, Rizzuto M, Beccafico S, Mammucari C, Boncompagni S, et al. Skeletal Muscle Is a Primary Target of SOD1^{G93A}-Mediated Toxicity. *Cell Metabol.* 2008; **8**: 425-436.
 20. Pansarasa O, Rossi D, Berardinelli A, Cereda C. Amyotrophic Lateral Sclerosis and Skeletal Muscle: An Update. *Mol. Neurobiol.* 2014; **49**: 984-990.
 21. Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell* 2010; **140**: 313–326.
 22. Wills J, Credle J, Oaks AW, Duka V, Lee JH, Jones J, et al. Paraquat, but not maneb, induces synucleinopathy and tauopathy in striata of mice through inhibition of proteasomal and autophagic pathways. *PLoS One* 2012; **7**: e30745, doi: 10.1371/journal.pone.0030745.
 23. Musaró A. State of the art and the dark side of amyotrophic lateral sclerosis. *World J. Biol. Chem.* 2010; **1**: 62–68.
 24. Douglass CP, Kandler RH, Shaw PJ. An evaluation of neurophysiological criteria used in the diagnosis of motor neuron disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2010; **81**: 646–649.
 25. Burgunder JM, Schöls L, Baets J, Andersen P, Gasser T, Szolnoki Z, et al. EFNS guidelines for the molecular diagnosis of neurogenetic disorders: motoneuron, peripheral nerve and muscle disorders. *Eur. J. Neurol.* 2011; **18**: 207–217, doi: 10.1111/j.1468-1331.2010.03069.x.
 26. Dobrowolny G, Aucello M, Rizzuto E, Beccafico S, Mammucari C, Boncompagni S, et al. Skeletal muscle is a primary target of SOD1^{G93A}-mediated toxicity. *Cell Metabolism* 2008a; **8**: 425-436.
 27. Crippa V, Carra S, Rusmini P, Sau D, Bolzoni E, Bendotti C, et al. A role of small heat shock protein B8 (HspB8) in the autophagic removal of misfolded proteins responsible for neurodegenerative diseases. *Autophagy* 2010; **6**: 958-960.
 28. Crippa V, Boncoraglio A, Galbiati M, Aggarwal T, Rusmini P, Giorgetti E, et al. Differential autophagy power in the spinal cord and muscle of transgenic ALS mice. *Frontiers in Cell Neurosci.* 2013; **7**: 1-12, doi: 10.3389/fncel.2013.00234.
 29. Grumati P, Bonaldo P. Autophagy in Skeletal Muscle Homeostasis and in Muscular Dystrophies. *Cells* 2012; **1**: 325-345, doi:10.3390/cells1030325.
 30. Garcia-Garcia A, Rodriguez-Rocha H, Tseng MT, Montes de Oca-Luna R, Zhou HS, McMasters KM, et al. E2F-1 lacking the transcriptional activity domain induces autophagy. *Cancer Biol. Ther.* 2012; **13**: 1091-1101.
 31. Polager S, Ofir S, Ginsberg D. E2F1 regulates autophagy and the transcription of autophagy genes. *Oncogene* 2008; **27**: 4860–4864.
 32. Araki W, Minegishi S, Motoki K, Kume H, Hohjoh H, Araki YM, et al. Disease-Associated Mutations of TDP-43 Promote Turnover of the Protein Through the Proteasomal Pathway. *Mol. Neurobiol.* 2014; Jan 30, doi.org/10.1007/s12035-014-8644-6.
 33. Wei R, Bhattacharya A, Chintalaramulu N, Jernigan AL, Liu Y, Van Remmen H, et al. Protein misfolding, mitochondrial dysfunction and muscle loss are not directly dependent on soluble and aggregation state of mSOD1 protein in skeletal muscle of ALS. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012; **417**: 1275-1279.

34. Dobrowolny G, Aucello M, Molinaro M, Musaró A. Local expression of mlgf-1 modulates ubiquitin, caspase and CDK5 expression in skeletal muscle of an ALS mouse model. *Neurol. Res.* 2008b; **30**: 131–136, doi: 10.1179/174313208X281235.
35. Battistelli M, Salucci S, Burattini S, Falcieri E. Further considerations on *in vitro* skeletal muscle cell death. *Muscles, Ligaments and Tendons Journal* 2013; **3**: 267-274.
36. Dobrowolny G, Aucello M, Musarò A. Muscle atrophy induced by SOD1^{G93A} expression does not involve the activation of caspase in the absence of denervation. *Skeletal Muscle* 2013; **1**: 3, doi: 10.1186/2044-5040-1-3.
37. Jang YC, Lustgarten MS, Liu Y, Muller FL, Bhattacharya A, Liang H, et al. Increased superoxide *in vivo* accelerates age associated muscle atrophy through mitochondrial dysfunction and neuromuscular junction degeneration. *FASEB J.* 2010; **24**: 1376-1390.
38. Zhang X, Li L, Chen S, Yang D, Wang Y, Zhang X, et al. Rapamycin treatment augments motor neuron degeneration in SOD1^{G93A} mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Autophagy* 2011; **7**: 412-425.
39. Carra S, Crippa V, Rusmini P, Boncoraglio A, Minoia M, Giorgetti E, et al. Alteration of protein folding and degradation in motor neuron diseases: Implications and protective functions of small heat shock proteins. *Progress in Neurobiol.* 2012; **97**: 83-100.
40. Oliván S, Calvo AC, Manzano R, Zaragoza P, Osta R. Sex Differences in Constitutive Autophagy. *BioMed Res. Int.* 2014; **2014**: 652817. doi: 10.1155/2014/652817.
41. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002; **3**: RESEARCH0034.
42. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc.* 2008; **3**:1101-1108.

FIGURE LEGENDS

Figure 1 *LC3*, *p62*, *Beclin1*, *Atg5* and *E2f1* mRNA expression levels in skeletal muscle from SOD1G93A mice. The transcript levels of these autophagy markers were analyzed at P40, P60, P90, and P120. Relative expression values of these autophagy markers in SOD1G93A mice (black bars) were represented in relation to the levels of their age-matched wild type mice (WT, grey bars) at each studied stage. Each data point represented the mean \pm SEM, balanced group n=10 animals per time-point and genotype. Asterisks denoted a student t-test *p* value <0.05 (*), <0.01 (**) and <0.001 (***).

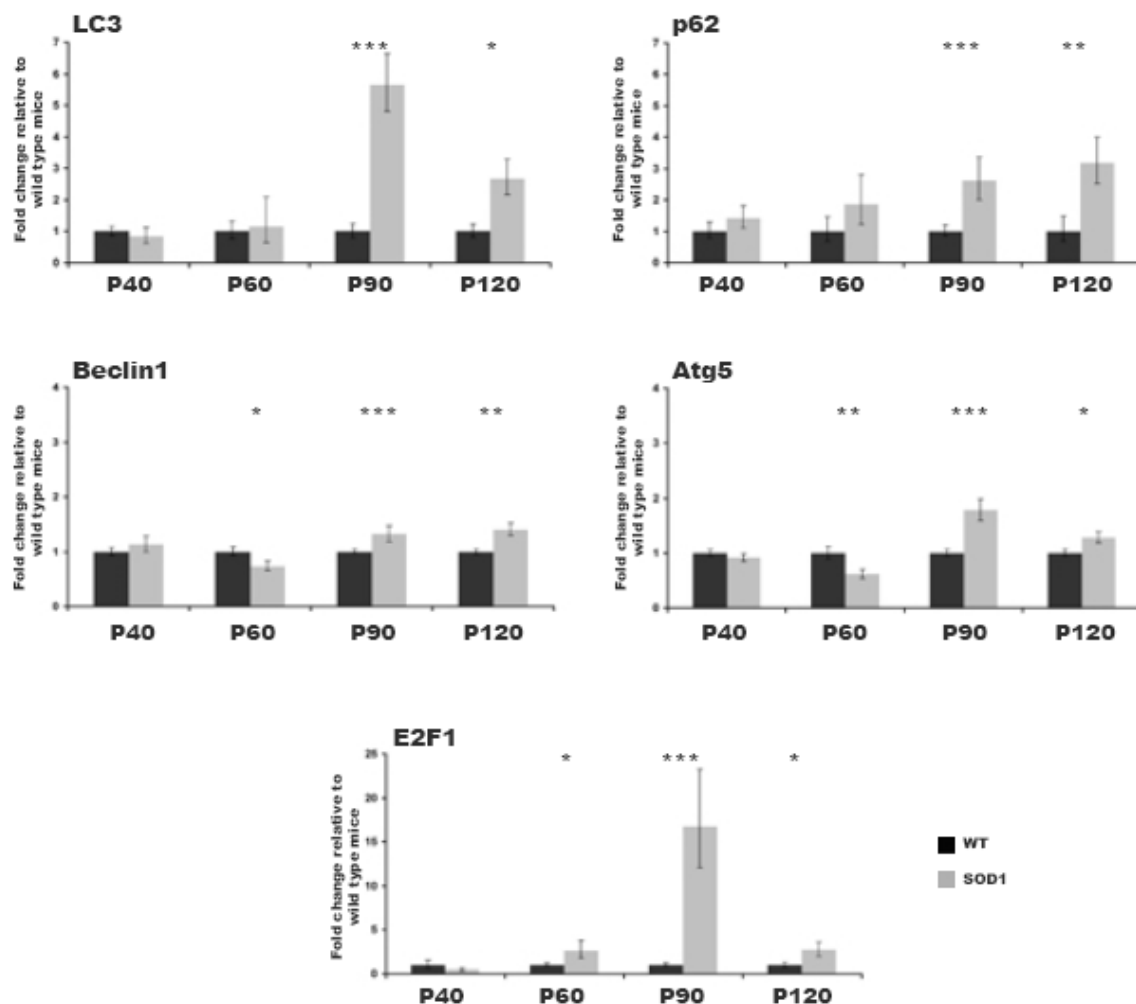


Figure 2 LC3-II, LC3-I and p62 protein expression in skeletal muscle. **(a)** Western blots for LC3-II, LC3-I and p62 protein levels in skeletal muscle from transgenic SOD1G93A mice (grey bars) and age-matched wild type mice (WT, black bars). GAPDH protein levels were used for the normalization of the protein levels of the selected autophagy markers. The representative blots for each stage of the disease are shown at the bottom. Data showed mean \pm SEM, balanced group $n=12$ animals per time-point and genotype. p value <0.05 (*) and <0.001 (***). **(b)** Relative expression levels of LC3-II in muscles from SOD1G93A mice at the terminal stage, before (light grey bars) and after chloroquine treatment (dark grey bars, CQ 100 μ M). The representative blots for each stage of the disease are shown at the bottom; GAPDH protein levels were used for the normalization of the data. Data showed mean \pm SEM, balanced group $n=6$ animals per time-point and genotype. p value <0.05 (*).

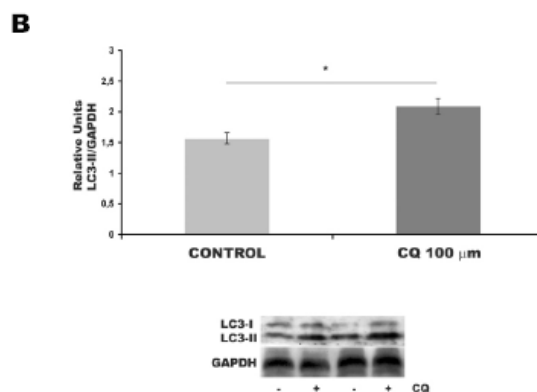
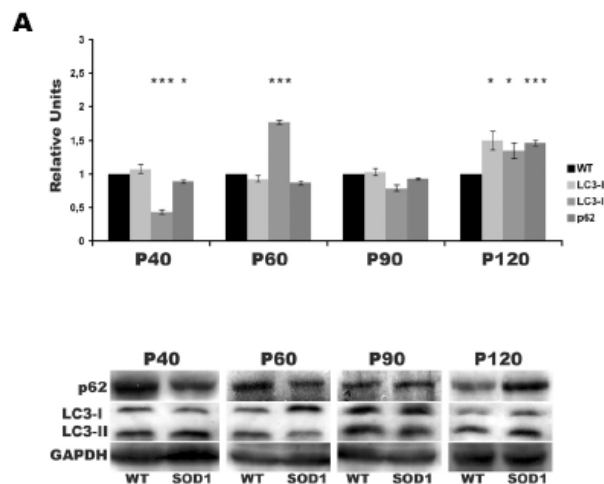


Figure 3 Proteasome activity measurements. Proteasome activity was measured in skeletal muscle homogenates from SOD1G93A mice (grey bars) and from age-matched wild type mice (WT, black bars) at each stage of the disease, P40, P60, P90 and P120. Data showed mean \pm SEM, balanced group $n=6$ animals per time-point and genotype. p value <0.05 (*) and <0.001 (**).

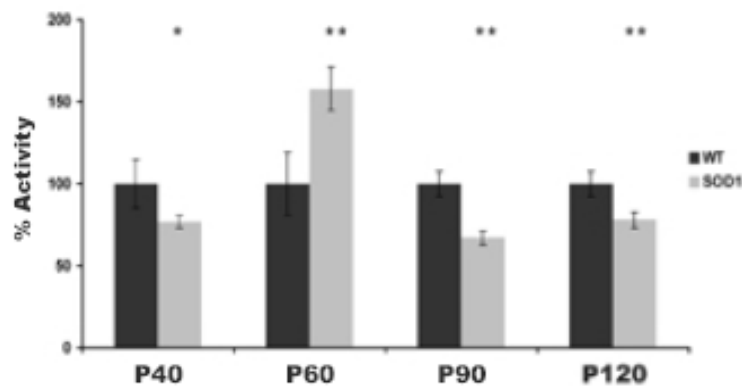


Figure 4 Protein expression profile in apoptotic markers along disease progression. Western blots for Bax, Bcl-2 and procaspase-3 protein levels in skeletal muscle from SOD1G93A mice (grey bars) and age-matched wild type mice (WT, black bars). GAPDH protein levels were used for the normalization of the protein levels of the selected autophagy markers. The representative blots for each stage of the disease are shown at the bottom. Data showed mean \pm SEM, balanced group $n=12$ animals per time-point and genotype. p value <0.05 (*) and <0.001 (**).

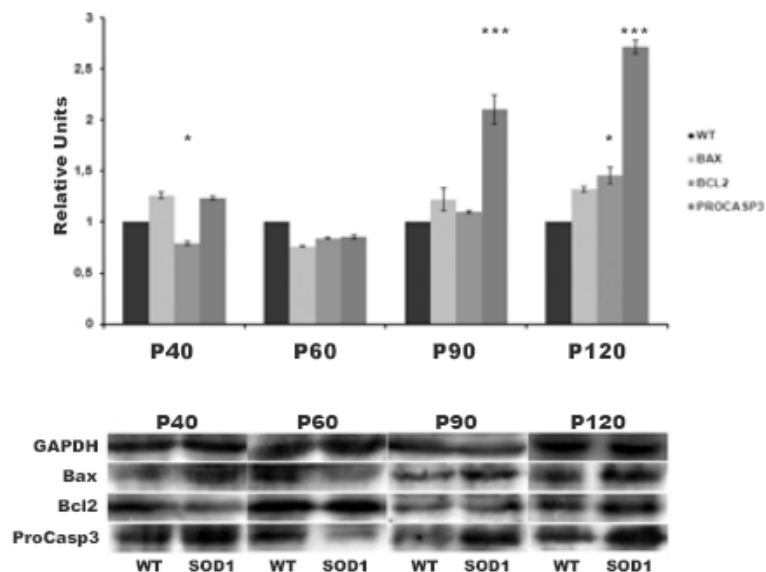
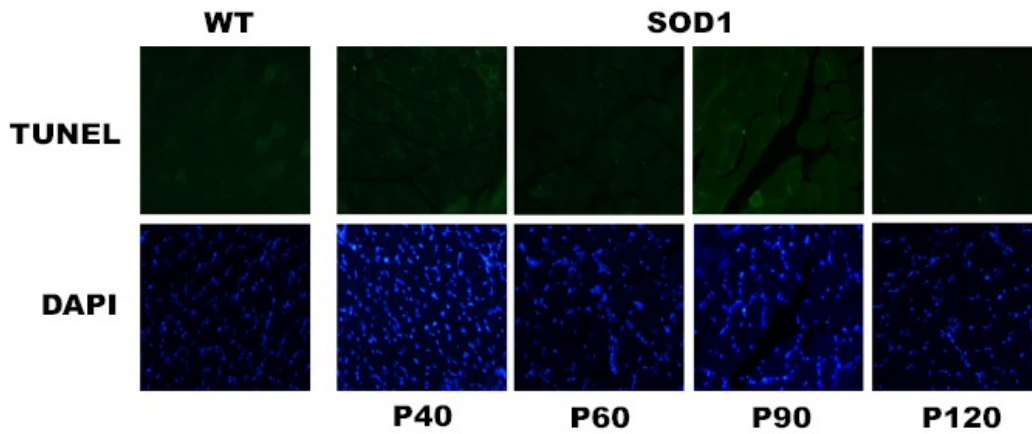


Figure 5 Detection of apoptotic nuclei by TUNEL assay. Representative skeletal muscle tissue blocks from SOD1G93A mice and age-matched wild type mice (WT) were analyzed by the TUNEL assay to determine apoptosis activation at each stage of the disease, P40, P60, P90 and P120. DAPI detection was also measured. Data showed mean \pm SEM, balanced group n=8 animals per time-point and genotype.





Comparative study of behavioural tests in the SOD1G93A mouse model of Amyotrophic Lateral Sclerosis

Oliván S, Calvo AC, Rando A, Muñoz MJ, Zaragoza P, Osta R

Enviado a BMC Neurology

ABSTRACT

Background: In preclinical trials, a sensitive functional test is required to detect changes in the motor behaviour of the SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). We evaluated changes in body weight and motor impairment in behavioural tests, such as the rotarod, the hanging-wire test and the treadmill, of transgenic and wild type mice. Results: We found differences in detection of the onset of symptoms and progression of the disease between the different tests assessed. Moreover, the data show significant gender differences in the motor behaviour of this mouse model. Conclusions: The rotarod and the hanging-wire test are more sensitive to detect early motor impairment. Moreover, the results suggest that the treadmill may serve as a comparable alternative to the rotarod and hanging-wire tests for characterising the ALS disease phenotype.

Keywords: amyotrophic lateral sclerosis, SOD1-G93A mice, rotarod, hanging wire test, treadmill, weight.

BACKGROUND

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a lethal neurodegenerative disorder that causes progressive paralysis and death within 3-5 years of diagnosis. During the last 20 years, the mouse model overexpressing SOD1 has been one of the most important research tools for scientists working in the field of ALS [1]. One of the best characterised SOD1 transgenic mouse strains carries the human SOD1G93A mutation. In this model, the SOD1 gene contains a glycine to alanine substitution at position 93, which results in a toxic gain of SOD1 function [2,3]. The high copy mutant SOD1G93A mice are phenotypically healthy until approximately 80-90 days old, when they develop symptoms of motor neuron disease, such as shaking limbs when suspended [4]. After 120 days, most of these mice are in the end stages of disease and become completely paralysed.

The SOD1G93A mice develop a progressive paralysis starting in the hind limbs via denervation of the neuromuscular junction. This denervation prompts an active degeneration of ventral root axons and a significant loss of alpha motor neurons. The moment at which early motor deficits appear needs to be accurately defined, especially when therapeutic strategies are tested. A thorough understanding of the motor behaviour of the mouse model as well as the motor function tests available is vital for the correct development of a behavioural analysis. Therefore, several methods should be considered in order to select the approach that most accurately addresses the experimental questions.

Semi-quantitative or descriptive methods (e.g., observation or stride length analysis) were initially used by researchers for assessing motor function in SOD1G93A mice [2]. Various tests, such as rotarod, hanging-wire, foot print or treadmill tests [5,6] have been performed to detect the onset and progression of neurodegenerative diseases when an experimental treatment is being studied. The treadmill was first used as a training system to study and test the motor phenotype [7,8]. Currently, complex and expensive systems based on computerised treadmill data are used to analyse walking pattern and to calculate standardised gait parameters [9,10]. This more novel system has been less frequently utilised, and consequently, less information about it has been reported. Thus, the purpose of this work was to analyse the treadmill as an effective alternative to the conventional behavioural tests. The experimental

variables included changes in body weight, survival rate, and motor function assessed with the rotarod, hanging-wire and treadmill tests.

MATERIALS AND METHODS

Animals. Animals were purchased from The Jackson Laboratory (B6SJL-Tg(SOD1-G93A)1Gur/J) and were housed under a standard light:dark (12:12 hour) cycle. Animals were provided with food and water *ad libitum* in the Servicio General de Apoyo a la Investigación-SAI of the Universidad de Zaragoza. Hemizygotic transgenic mice were obtained by mating transgenic males with F1 hybrid females (B6SJL). Transgenic mice were identified by PCR assay of DNA extracted from the tail with specific primers for human SOD1 (according to The Jackson Laboratory protocol). Wild type littermates were used as controls of the transgenic mice for behavioural tests. All of the procedures were approved by the in-house Ethics Committee for Animal Experiments of the Universidad de Zaragoza. Animal care and experimentation were performed according to the Spanish Policy for Animal Protection RD1201/05, which meets the European Union Directive 86/609 on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes.

During late-stage disease, access to food and water were provided. Euthanasia was performed when mice failed to right themselves within 30 seconds of being placed on their side (disease endpoint) [11].

Body weight and behaviour tests were performed weekly during the morning, beginning at postnatal (P) day 60 until the death of the animals.

Rotarod test. Motor coordination, strength and balance were assessed using a rotarod (ROTA-ROD/RS, LE8200, LSILETICA Scientific Instruments; Panlab, Barcelona, Spain). Mice started to train on the rotarod daily one week before recording the data. Animals were placed onto the cylinder at a constant speed of 14 rpm. The animals had three attempts to remain on the rotarod for a maximum of 180 seconds per trial, and the longest latency was recorded.

Hanging-wire test

Neuromuscular strength was tested by the hanging-wire test. Each mouse was placed on a wire lid of a conventional housing cage and the lid was turned

upside down. The latency from the beginning of the test until the mouse stood with at least two limbs on the lid was timed. The animals had three attempts to stand for a maximum of 180 seconds per trial, and the longest latency was recorded.

Treadmill. Animals were subjected to involuntary exercise on a rodent treadmill (1055SDRM Columbus Instruments, Columbus, OH, USA). Motor activity was registered 3 days per week beginning at 45 days of age. To encourage the mice to run, the treadmill was equipped with an electrical shock grid at the rear of the treadmill. The shock grid was set to deliver 0.3 mA, which caused an uncomfortable shock but did not physically harm or injure the animals. Three speeds were analysed (11, 22 and 44 cm/s) during 10 minutes at 5° incline. Performance was measured based on the time each mouse stayed on the shock grid. The more disease progression an animal had experienced, the more time it spent on the shock grid.

Statistical analysis. All data were analysed by two-tailed Student's *t*-tests and two-way analysis of variance (ANOVA). Survival and disease onset were plotted on Kaplan-Meier curves and analysed using the log-rank test. Statistical analyses were performed in SPSS version 19.0 (IBM). Data were presented as mean \pm the standard error of the mean (SEM). Significance was set at a *p*-value of less than 0.05.

RESULTS

Body weight and survival. As shown in the figure 1A, wild type animals, or control group, increased their weight continuously and they never showed motor symptoms. From P61 to P142 the transgenic males always weighted more than females ($p < 0.01$). Maximum weight was reached at P103 in males and females, from this time the weight started to decrease gradually. At the end of the experiment, transgenic animals lost up to 27% (males) and 16% (females) of his maximum weight. From P117 the weight loss was more important and fast in transgenic mice. Furthermore, comparing wild type mice to their transgenic

mate of different sex separately, the weight loss began to be significant around P96 ($p < 0.05$) in males while in females, this loss was found at P117 ($p < 0.05$).

When survival time was analyzed, no statistical significant difference was observed between males and females (Fig. 1B). Transgenic males showed a mean life span of 135.6 ± 1.6 days, while the mean in females was observed at 137.7 ± 1.6 days.

Rotarod test. Significant differences between control and transgenic mice was observed at P89 ($p < 0.05$) and P96 ($p < 0.001$) until the endpoint. In particular, some transgenic males showed early symptoms around P75, although from P82 these symptoms became more evident (Fig. 2). In contrast females showed early symptoms at P82 and started to decline around P96, although the performance was worse from P103, which was coincident with the maximum weight observed ($p < 0.05$, $p < 0.001$). During disease progression significant differences were not detected between transgenic males and females, and in both sexes, a similar progression was observed, showing transgenic male mice more motor deficits than transgenic female mice.

Hanging-wire test. Motor symptoms appeared earlier in transgenic males (P68) than transgenic females (P82), although in both sexes a similar test evolution was observed (Fig. 3A). The decline began to be significant at P82 ($p < 0.05$) and continued until the end ($p < 0.001$) when control and transgenic mice, males and females, were compared. Significant differences between transgenic male and female mice were detected at P103, which was coincident with the maximum weight observed, P110 and P117 days of life, in which the most important and fast loss of weight was registered ($p < 0.01$).

Treadmill. When the speed was set at 11 cm/s on the treadmill, the first motor deficits were detected at P109 in transgenic males and P120 in transgenic females (Fig. 4A). However, significant motor function began to get worse at P116 ($p < 0.05$) in males and P123 in females ($p < 0.05$), becoming gradually aggravated ($p > 0.001$). At 22 cm/s alterations in motor function were detected earlier at P104 in males and at P108 in females (Fig. 4B). Significant differences were detected at P111 in males and at P118 in females and from these points

significance increased ($p < 0.001$). Finally, at 44 cm/s some animals had problems to reach the performance from the beginning, showing males more motor difficulties than females (Fig. 4C). Significant differences at P106 in males and P111 in females, comparing to wild-type, were visible ($p < 0.05$) and motor dysfunction became more evident at P113 ($p < 0.001$). At P74, transgenic mice (males and females) showed the first alteration in their motor behaviour.

DISCUSSION

The most objective and simple parameter to first characterize transgenic SOD1G93A mice is the body weight, which is also virtually observer independent. ALS, in fact, is accompanied by a significant weight loss in both human and mice.

Studies of SOD1G93A mice confirmed that changes in body weight occurred as a sign of motor neuron death over the course of the disease. This is a rather unspecific characteristic and it can be due to many conditions such as dehydration or malnutrition, developmental abnormalities [12], background strain [10] or orolingual motor deficits [13]. However, the age at which these changes occur differs substantially among published studies. Our results are coincident with the ones described by Azari, Hayworth or Smittkamp who reported stable body weight in transgenic mice from P55 to P125 to finally decrease during end-stage disease. Furthermore, reported differences in body weight between transgenic mice and control mice emerging from P98 to P126 have been also described [15-17]. Therefore these results suggested that weight loss was not an accurate measurement of disease onset or progression in this animal model of ALS.

Differences between transgenic male and female mice have been described in several studies, not only about weight or survival, but also about onset and progression disease [18,8]. In case of survival rate, genetic background studies in this model described longer survival in transgenic females than in transgenic males [7,15,18], albeit females survived two more days than males in our study, no significant gender differences were detected [19,20]. Moreover we found that transgenic male mice exhibited more severe symptoms including earlier

onset and motor deficits than transgenic female mice in each behaviour test assessed. In rotarod, hanging wire test and treadmill, the male mice showed deficits before females, therefore the differences in disease progression between males and females are obvious. But only in the case of hanging wire test significant differences appeared between transgenic male and female mice, so our results are consistent with previous reports that transgenic females displayed motor symptom later than transgenic male mice with no evidence of higher survival rates. These discrepancies may be related to the copy number of the transgene, the mouse background, the experimental protocol (food supplies in final stage) or estrogens effects [18]. On view of these results, we recommend that gender should be taken into account in experimental design since the behavioural differences seem to contribute to variability.

The most frequently used analysis of motor impairment in mice is the rotarod test which let us register how long the animals were able to run on a rotating cylinder [17]. The rotarod test is a complex task that requires good motor coordination and balance in addition to strength; a decline in motor strength is specific for ALS disease. Hence a decline in rotarod performance is a rather indirect measurement of the motor deficit. However, the lack of sensitivity of this test to detect motor deficits prior to the onset of clinical symptoms has been widely discussed and other tests have been also used to expand the time frame to detect early changes [4,9]. Although the first motor dysfunction evidence appeared in the pre-symptomatic phase (P75 in males and P82 in females), transgenic male mice showed this motor dysfunction 2 weeks later while transgenic female mice displayed it 3 weeks later since the deficits began to be significant. The performance progression observed for this test was similar to that described by Alves or Smitkamp. The wide variety of results could be explained by differences in training days, protocols performance or genetic background of mice model. Overall, previous experiences in our group have demonstrated that animals must be training before, and the training should realize at least one week before starting the experiments in order to ensure proper test development if early symptoms want to be detected [21].

The hanging wire test requires only balance and grip strength [12] and there is no need for any significant training of the mice. The simplicity (a conventional cage lid), reliability and improved diagnostic accuracy of this test are a great

advantage. Our results are in agreement with Hayworth and Gonzalez-Lima, and Smittkamp which reported the first muscle limb weakness changes at P68 in transgenic females and P82 in transgenic males. Moreover we found that disease progression was better endured by transgenic female mice than transgenic male mice, which is in accordance to Choi, and this gender differences were significant during symptomatic stage (P103, P110 and P117). Therefore, we could be able to detect early motor performance deficits, suggesting this test as a good choice among the rest.

Treadmill-based systems have been suggested as a better way to monitor gait dysfunction and disease progression in models of genetic neurological disorders [10] and as a training system to evaluate the benefit of physical activity in ALS [7,8]. As compared to the methods that do not use computerized acquisition and analysis (footprints), the computerized gait analysis systems are marketed as a more efficient, sensitive and reliable way to measure motor deficits [22]. This system can incorporate a video camera for capture of paw placement, so parameters like stride, swing or stance time are able to be analyzed [9].

Among the speeds we applied in this test, we found that the slow and medium speeds (11 and 22 cm/s) were unable to detect motor deficits before P100, and as a consequence it was possible that mice could offset the loss of hind limb muscle strength, unlike the results observed in the rotarod test. When we worked at 44 cm/s the deficits were detected before (around P74), which is in agreement with Guillot and Wooley. At this point, the treadmill was able to detect early symptoms as well as the rotarod or the hanging-wire test. We therefore suggest, an intermediate speed between 22 and 44 cm/s, that could be enough to detect early motor symptoms and therefore it could not cause excessive attrition, especially in the case of transgenic male mice. Moreover, this system is also able to change the conditions of the test (belt inclination for example), so new protocols of resistance and strength are possible; and the training is not required. In addition, these results are in accordance with the speed range used in the same animal model [23] and highlight the importance of using a particular speed value in treadmill, especially when further molecular and cellular studies are needed. However, comparing treadmill to rotarod test we found a best sensitivity in rotarod test as we could detect the first significant

motor deficit symptoms in transgenic mice at P90 in rotarod test while this detection was found since P106 in treadmill.

CONCLUSIONS

The results show gender differences in the motor impairment, so balanced groups must be taken into account in the experimental design in order to avoid any sex bias. The clinical phenotype in SOD1 transgenic mice is perfectly characterized by the conventional behavioural tests such as rotarod and hanging-wire, as shown by the data. Moreover, our results suggested that the use of treadmill can represent an alternative to rotarod or hanging-wire test when an appropriate speed is used.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

S.O., R.O., M.J.M. and P.Z. conceived and designed the experiments. S.O. and A.R. performed the experiments. S.O. and A.C.C. analysed the data. S.O. and A.C.C. wrote the paper.

ACKNOWLEDGEMENTES

The authors would like to acknowledge the use of Servicios Científico-Técnicos del CIBA (Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud-SAI Universidad de Zaragoza), especially to Miriam de la Torre, Silvia Garcés, Pilar Lierta, Susana Murillo and Eduardo Romanos for their expert technical assistance.

FUNDING

This work was supported by grants PI10/0178 from Fondo de Investigación Sanitaria of Spain, ALS Association nº 554406 and Ministerio de Ciencia e Innovación INNPACTO IPT-2011-1091-900000.

REFERENCES

- [1] Shibata N: Transgenic mouse model for familial amyotrophic lateral sclerosis with superoxide dismutase-1 mutation. *Neuropathology* 2001, 21:82-92.
- [2] Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, Caliendo J, Hentati A, Kwon YW, Deng HX, et al: Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu, Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 1994, 264:1772-5.
- [3] Yim MB, Kang JH, Yim HS, Kwak HS, Chock PB, Stadtman ER: A gain-of-function of an amyotrophic lateral sclerosis-associated Cu,Zn-superoxide dismutase mutant: An enhancement of free radical formation due to a decrease in Km for hydrogen peroxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996, 93:5709-14.
- [4] Azzouz M, Leclerc N, Gurney M, Warter JM, Poindron P, Borg J: Progressive motor neuron impairment in an animal model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 1997, 20:45-51.
- [5] Brooks SP, Dunnett SB. Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. *Nat Rev Neurosci* 2009, 10:519-29. Review.
- [6] Ludolph AC, Bendotti C, Blaugrund E, Chio A, Greensmith L, Loeffler JP, Mead R, Niessen HG, Petri S, Pradat PF, et al: Guidelines for preclinical animal research in ALS/MND: A consensus meeting. *Amyotroph Lateral Scler* 2010, 11:38-45.
- [7] Kirkinetzos IG, Hernandez D, Bradley WG, Moraes CT: Regular exercise is beneficial to a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2003, 53:804-7.
- [8] Veldink JH, Bär PR, Joosten EA, Otten M, Wokke JH, van den Berg LH: Sexual differences in onset of disease and response to exercise in a transgenic model of ALS. *Neuromuscul Disord* 2003, 13:737-43.
- [9] Mancuso R, Oliván S, Osta R, Navarro X: Evolution of gait abnormalities in SOD1 G93A transgenic mice. *Brain Res* 2011, 1406:65-73.
- [10] Wooley CM, Sher RB, Kale A, Frankel WN, Cox GA, Seburn KL: Gait analysis detects early changes in transgenic SOD1 (G93A) mice. *Muscle Nerve* 2005, 32:43-50.
- [11] Azzouz M, Ralph GS, Storkebaum E, Walmsley LE, Mitrophanous KA, Kingsman SM, Carmeliet P, Mazarakis ND: VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS model. *Nature* 2004, 429:413-7.
- [12] Crawley JN: *What's wrong with my mouse?*. Behavioral Phenotyping of Transgenic and Knockout Mice. John Wiley & Sons, Inc., New York. 2000
- [13] Smittkamp SE, Brown JW, Stanford JA: Time-course and characterization of orolingual motor deficits in B6SJL-Tg (SOD1-G93A) 1Gur/J mice. *Neuroscience* 2008, 151:613-21
- [14] Azari MF, Lopes EC, Stubna C, Turner BJ, Zang D, Nicola NA, Kurek JB, Cheema SS: Behavioural and anatomical effects of systemically administered leukemia inhibitory factor in the SOD1(G93A G1H) mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res* 2003, 982:92-7.
- [15] Alves CJ, de Santana LP, dos Santos AJ, de Oliveira GP, Duobles T, Scorisa JM, Martins RS, Maximino JR, Chadi G: Early motor and electrophysiological changes in transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis and gender differences on clinical outcome. *Brain Res.* 2011, 1394:90-104.

- [16] Tankersley CG, Haenggeli C, Rothstein JD: Respiratory impairment in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Appl Physiol* 2007, 102:926-32.
- [17] Weydt P, Hong SY, Kliot M, Möller T: Assessing disease onset and progression in the SOD1 mouse model of ALS. *Neuroreport* 2003, 14:1051-4.
- [18] Choi CI, Lee YD, Gwag BJ, Cho SI, Kim SS, Suh-Kim H: Effects of estrogen on lifespan and motor functions in female hSOD1 G93A transgenic mice. *J Neurol Sci* 2008, 268:40-7.
- [19] Hayworth CR, Gonzalez-Lima F: Pre-symptomatic detection of chronic motor deficits and genotype prediction in congenic B6.SOD1 (G93A) ALS mouse model. *Neuroscience* 2009, 164:975-85.
- [20] Knippenberg S, Thau N, Dengler R, Petri S: Significance of behavioural tests in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Behav Brain Res* 2010, 213:82-7.
- [21] Miana-Mena FJ, Muñoz MJ, Yagüe G, Mendez M, Moreno M, Ciriza J, Zaragoza P, Osta R: Optimal methods to characterize the G93A mouse model of ALS. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 2005, 6:55-62.
- [22] Guillot TS, Asress SA, Richardson JR, Glass JD, Miller GW: Treadmill gait analysis does not detect motor deficits in animal models of Parkinson's disease or amyotrophic lateral sclerosis. *J Mot Behav* 2008, 40:568-77.
- [23] Gerber YN, Sabourin JC, Hugnot JP, Perrin FE: Unlike physical exercise, modified environment increases the lifespan of SOD1G93A mice however both conditions induce cellular changes. *PLoS One* 2012, 7(9).

FIGURE LEGENDS

FIG 1

Body weight and survival time. (A) Changes over time in weight of male (black) and female (grey) wild type and transgenic mice (WT males n=10, WT females n=10, transgenic females n=43 and transgenic males n=43). Data are shown as mean \pm SEM. (B) Kaplan-Meier survival comparison of the male and female transgenic mice. No significant differences were detected between transgenic male and female mice.

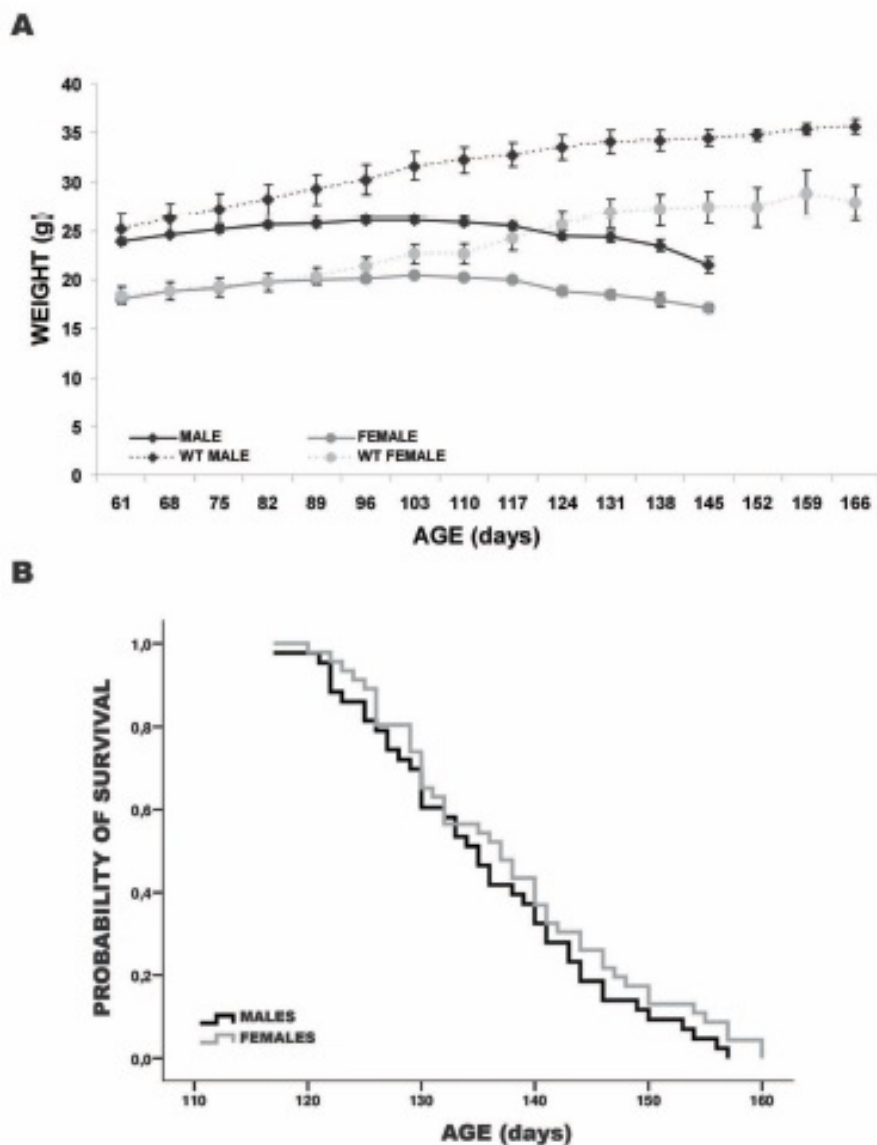


FIG 2

Rotarod test. Changes over time in rotarod test performance of male (black) and female (grey) wild type and transgenic mice (WT males n=10, WT females n=10, transgenic females n=15 and transgenic males n=15). Data are shown as mean \pm SEM. Student's *t*-test: **p*<0.05 and ****p*<0.001 (male mice), †*p*<0.05 and †††*p*<0.001 (female mice).

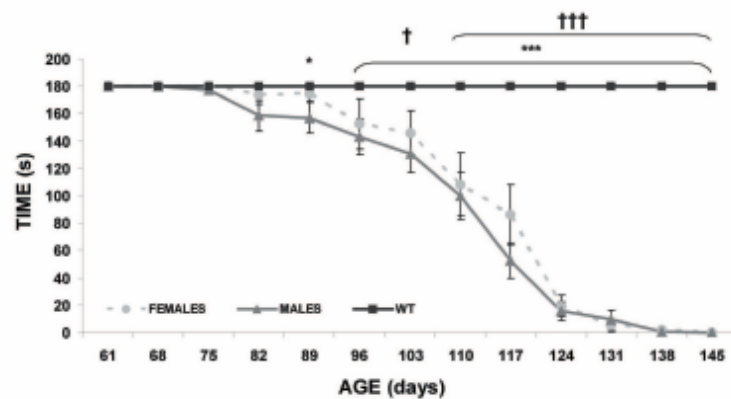


FIG 3

Hanging-wire test. Changes over time in hanging-wire test of male (black) and female (grey) wild type and transgenic mice (WT males n=10, WT females n=10, transgenic females n=15 and transgenic males n=15). Data are shown as mean \pm SEM. Student's *t*-test: **p*<0.05 and ****p*<0.001 (male mice), †*p*<0.05 and †††*p*<0.001 (female mice).

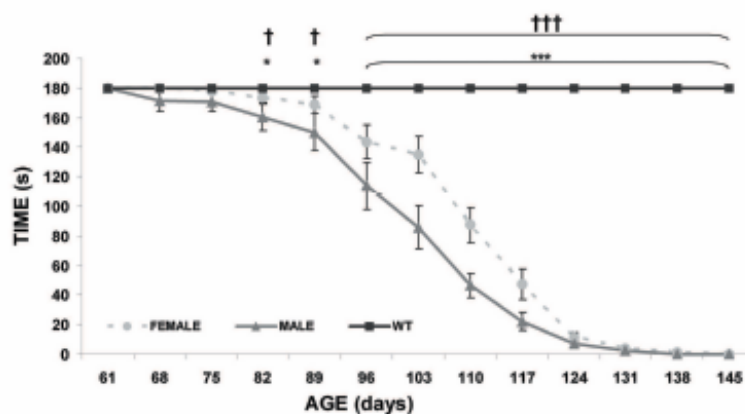
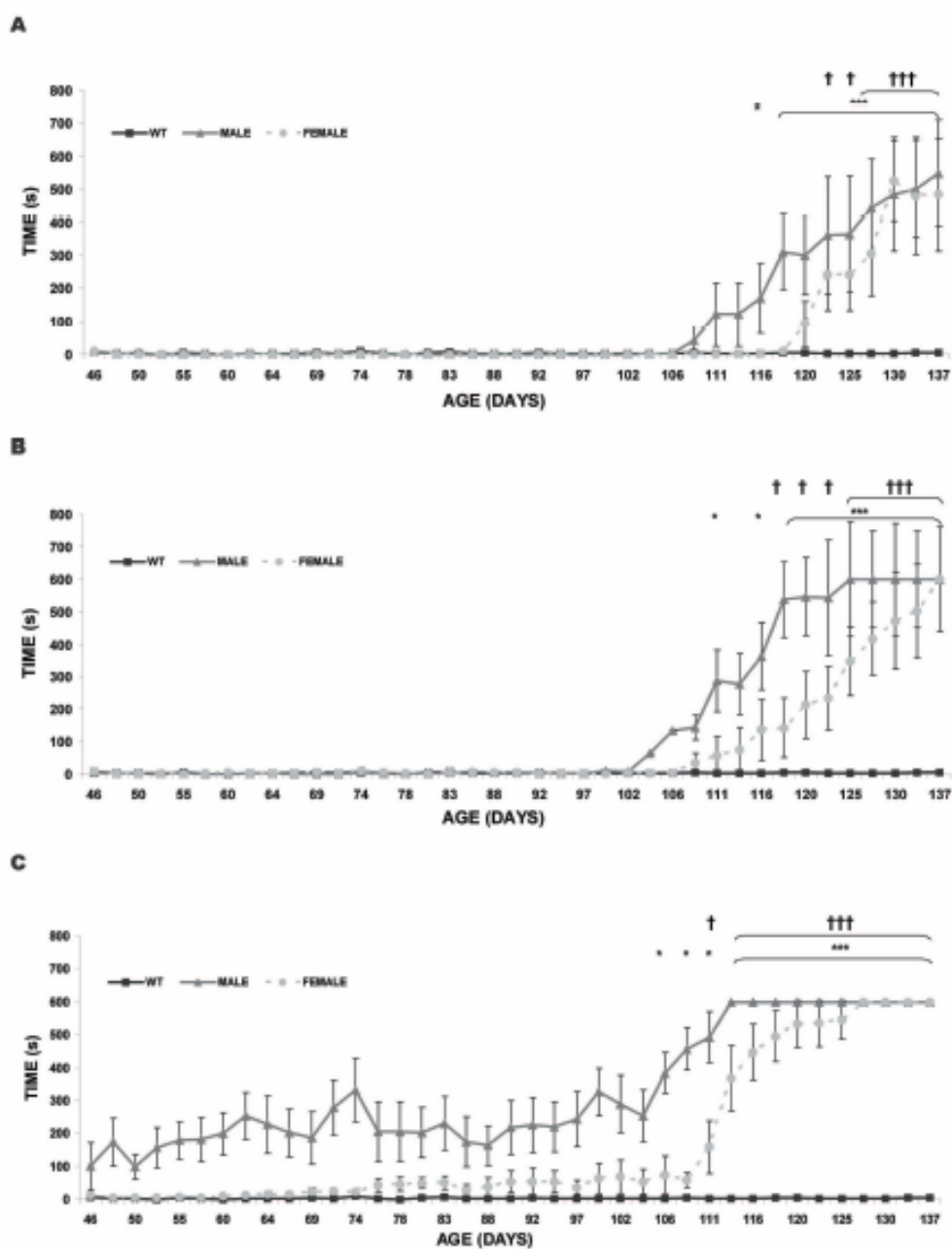
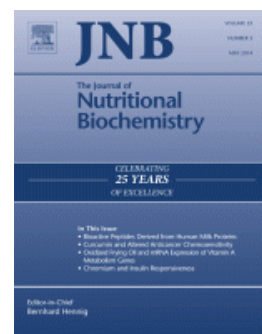


FIG 4

Treadmill performance of transgenic and wild type mice. The shock time (s) was registered at 3 speeds (11, 22 and 44 cm/s) from P45 to P137 (WT males n=10, WT females n=10, transgenic females n=10 and transgenic males n=10). Data are shown as mean \pm SEM. (A) Results at 11 cm/s. (B) Results at 22 cm/s. (C) Results at 44 cm/s. Student's *t*-test: * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ (male mice), † $p < 0.05$ and ††† $p < 0.001$ (female mice).



5.4 MANUSCRITO 4



Extra virgin olive oil intake delays the development of Amyotrophic Lateral Sclerosis associated with reduced reticulum stress and autophagy in muscle of SOD1G93A mice

Oliván S, Martínez-Beamonte R, Calvo AC, Surra JC, Manzano R, Arnal C, Osta R, Osada J

Journal of Nutritional Biochemistry (in press)

Accepted Manuscript



Extra Virgin Olive Oil Intake Delays the Development of Amyotrophic Lateral Sclerosis Associated with Reduced Reticulum Stress and Autophagy in Muscle of SOD1G93A Mice

Sara Olivan, Roberto Martínez-Beamonte, Ana C. Calvo, Joaquín C. Surra, Raquel Manzano, Carmen Arnal, Rosario Osta, Jesús Osada

PII: S0955-2863(14)00093-X
DOI: doi: [10.1016/j.jnutbio.2014.04.005](https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.04.005)
Reference: JNB 7197

To appear in: *The Journal of Nutritional Biochemistry*

Received date: 16 December 2013
Revised date: 27 March 2014
Accepted date: 6 April 2014

Please cite this article as: Olivan Sara, Martínez-Beamonte Roberto, Calvo Ana C., Surra Joaquín C., Manzano Raquel, Arnal Carmen, Osta Rosario, Osada Jesús, Extra Virgin Olive Oil Intake Delays the Development of Amyotrophic Lateral Sclerosis Associated with Reduced Reticulum Stress and Autophagy in Muscle of SOD1G93A Mice, *The Journal of Nutritional Biochemistry* (2014), doi: [10.1016/j.jnutbio.2014.04.005](https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.04.005)

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

ABSTRACT

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease associated with mutations in antioxidant enzyme Cu/Zn-superoxide dismutase 1 (SOD1). Albeit there is no treatment for this disease, new insights related to an exacerbated lipid metabolism have been reported. In connection with the hypermetabolic lipid status, the hypothesis whether nature of dietary fat might delay the progression of the disease was tested by using a transgenic mouse that overexpresses the human SOD1G93A variant. For this purpose, SOD1G93A mice were assigned randomly to one of the following three experimental groups: 1) a standard chow diet (control, n=21), 2) a chow diet enriched with 20% (w/w) extra virgin olive oil (EVOO, n=22), and 3) a chow diet containing 20% palm oil (palm, n=20). They received the diets for 8 weeks and the progression of the disease was assessed. On the standard chow diet, average plasma cholesterol levels were lower than those mice receiving the high fat diets. Mice fed an EVOO diet showed a significant higher survival and better motor performance than control mice. EVOO group mice survived longer, showed better motor performance and larger muscle fiber area than animals receiving palm. Moreover, the EVOO-enriched diet improved the muscle status as shown by expression of myogenic factors (Myod1 and Myog) and autophagy markers (LC3 and Beclin1), as well as diminished ER stress through decreasing Atf6 and Grp78. Our results demonstrate that EVOO may be effective in increasing survival rate, improving motor coordination together with a potential amelioration of ER stress, autophagy and muscle damage.

Key words · Extra virgin olive oil · Palm oil · Amyotrophic Lateral Sclerosis · Reticulum stress · autophagy · Cu/Zn-superoxide dismutase 1 · SOD1G93A mice

Abbreviations: apo, apolipoprotein; FPLC, fast performance liquid chromatography; HDL, high density lipoproteins; LDL, low density lipoproteins; P, post natal day; TG, triglycerides; VLDL, very low density lipoproteins.

INTRODUCTION

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is an adult-onset disease characterized by the selective loss of motor neurons in the brain and spinal cord, resulting in progressive paralysis and death. In one fifth of familial ALS, the disease has been found associated with mutations in the major antioxidant enzyme Cu/Zn-superoxide dismutase 1 (SOD1) [1-3], and transgenic mice overexpressing mutant forms of SOD1 [4] are considered good animal models for ALS since they show most of features of the human disease. Studies using these mice have proved that mutant SOD1 (mSOD1) triggers ALS by attacking motor neurons, astrocytes and microglia [5]. These mice also show a hypermetabolic state mainly of muscular origin [6] and involving a rapid removal of lipids [7]. Consequently, the increase in the energy content of the diets prolonged lifespan and maintained motor neuron [6, 8], while restricting calorie intake worsened the disease [9]. Furthermore, by generation of a transgenic mouse model expressing a mutant SOD1G93A selectively in skeletal muscle, it has been demonstrated that skeletal muscle is a primary target of SOD1G93A-mediated toxicity and that oxidative stress triggers muscle atrophy [10].

A higher adherence to a Mediterranean-type diet has been associated with lower Alzheimer disease risk and may be protective against stroke and other neurological disorders (Martinez-Gonzalez et al. 2002; Scarmeas et al. 2009; Estruch et al. 2013). The Mediterranean diet is characterized by high fat, mainly from olive oil, complex carbohydrates in the form of cereals and legumes, high fiber in the form of fruit and vegetables, and the limited consumption of animal proteins, representing a design tested by populations in the Mediterranean Basin for more than 2000 years. Olive oil, as the main source of fat in the traditional Mediterranean diet, has been object of considerable attention regarding to its potential benefits. In this regard, its intake has been shown to improve cardiovascular risk factors, such as lipid profiles, blood pressure, postprandial hyperlipidemia, endothelial dysfunction, oxidative stress, and antithrombotic profiles (Lopez-Miranda et al. 2010). Using genetically modified mice that spontaneously develop atherosclerosis, we have proved that extra virgin olive oil was highly beneficial when consumed judiciously and in diets of low cholesterol content (Guillen et al. 2009).

As above mentioned, the studies suggesting that high-fat diets may have an effect in delaying the development of the ALS did not address the influence of different sources of fat. In addition due to the described beneficial effects of extra virgin olive oil, it is suggestive that feeding this oil may also own a positive effect on the ALS outcome. To test the hypothesis, we fed SOD mice high fat diets containing extra virgin olive oil or palm oil and evaluated their clinical performance. To determine the mechanisms involved, we performed an analysis of muscle gene expression.

MATERIAL AND METHODS

Animals. Animals were purchased from The Jackson Laboratory (B6SJL-Tg(SOD1-G93A)1Gur/J) and hemizygotic transgenic mice were obtained by mating transgenic males with F1 hybrid females (B6SJL). Transgenic mice were identified by PCR assay of DNA extracted from the tail with specific primers for human SOD1 (according to The Jackson Laboratory protocol). Animals were provided with food and water ad libitum and housed under a standard light:dark (12:12 hour) cycle in the Servicio General de Apoyo a la Investigación- SAI of the Universidad de Zaragoza. All of the procedures were approved by the in-house Ethics Committee for Animal Experiments of the Universidad de Zaragoza. Animal care and experimentation were performed according to the Spanish Policy for Animal Protection RD53/2013, which meets the European Union Directive 2010/63/UE on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes.

Dietary Trial. Two-month old female SOD1G93A mice on the same genetic background (B6SJL) and hemyzygous for the mutation were assigned randomly to one of the following three experimental groups: 1) a control group (n=21) fed a standard chow diet, 2) an olive-oil group (n=22) fed a diet enriched in (20%, w/w) extra virgin olive oil from Empeltre cultivar (Muniesa, Belchite, Spain), and 3) palm oil group (n=20) fed a diet containing 20% palm oil. The standard mouse chow diet was Teklad Mouse/Rat Diet no. 2014 (Harlan Teklad; Harlan Ibérica, Barcelona, Spain). To avoid the potential confounding effects of variation between batches of chow, 25 kg from a single batch were reserved and used

to prepare diets and feed experimental groups throughout the experiment. Weekly diets were stored in N₂ at -20°C and their composition analyzed, as previously described [16]. The chemical composition of the diets is shown in Table 1. Olive oil and palm oil diets were isocaloric. These high-fat diets were lower in carbohydrates, had slightly lower protein content and a higher percentage of fat and vitamin E than the chow diet. Chow diet had a monounsaturated fatty acid content of 20.5 % of total fat and a higher amount of polyunsaturated than saturated fatty acids (P/S ratio 3.4). The high-fat diets contained a similar amount of polyunsaturated fatty acid and differed in the amount of monounsaturated and saturated fatty acids. The olive oil-enriched diet the P/S ratio was 2.9, which indicates an important decrease in saturated fatty acids compared to the palm oil-containing diet. Likewise, the olive oil diet was enriched in phenolic compounds. The nutritional intervention was well tolerated and lasted until the animal death

Behavioral Tests. In a subset of 10 females per experimental group, motor coordination, strength and balance were assessed using a rotarod (Panlab, Barcelona, Spain). Animals were placed onto the cylinder at a constant speed of 14 rpm. Also, neuromuscular strength was tested by the hanging-wire test. Each mouse was placed on a wire lid of a conventional housing cage and the lid was turned upside down. The latency from the beginning of the test until the mouse stood with at least two limbs on the lid was timed. In both tests, the animals had three attempts to stand for a maximum of 180 seconds per trial, and the longest latency was recorded. The onset of symptoms was scored as the first day that a mouse could not remain on the hanging wire for 3 min. Behavioral tests were performed weekly during the morning, beginning at postnatal day 77 (P77) until the death of the mice. During late-stage disease, mice were assisted to access to food and water. Euthanasia was performed when mice failed to right themselves within 20 seconds of being placed on their side [17].

Plasma Determinations. Those surviving mice from the three experimental groups not used for the behavioral tests were sacrificed by suffocation in CO₂ at 120 days of age (terminal stage) and after a four- hour-fasted regimen, and blood was drawn from the heart. Gastrocnemius and tibial anterior muscles were

obtained, and a piece of them was immediately frozen in liquid N₂ for RNA isolation while the other was preserved in buffered formaldehyde for histological analysis. Plasma total cholesterol (TC), and triglyceride (TG) concentrations were measured in a microtitre assay, using commercial kits from Thermo (Madrid, Spain). Apolipoproteins A1, A4 and B were quantified by enzyme-linked immunosorbent assays with specific polyclonal antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, and Biodesign, Saco, ME, USA) as previously described [18]. Plasma lipoprotein profiles were also determined in 100 μ L of pooled plasma samples by fast protein liquid chromatography (FPLC) gel filtration [16] using a Superose 6B column (Amersham Pharmacia, Barcelona, Spain). The contents of cholesterol, phosphatidylcholine and sphingomyelin in each fraction were assayed as described [19].

HDL reactive oxygen species. The presence of reactive oxygen species (ROS) in this lipoprotein fraction was assessed by measuring the conversion of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) into fluorescent dichlorofluorescein (DCF) [20]. Briefly, the FPLC-separated HDL fractions (5 μ g of cholesterol) were incubated, at 37° C with 2 μ g of DCF, in 25 μ l of 0.1% sodium azide and 100 μ l of PBS, up to a total volume of 150 μ l [21]. The fluorescence was measured after 3 h of incubation at 485 nm excitation and 535 nm emission wavelengths in a microplate reader (SPECTRAfluor Plus, TECAN).

RNA Preparation and Analysis. Muscle RNA was isolated using Tri Reagent (Sigma). DNA contaminants were removed by TURBO DNase treatment using the DNA removal kit from AMBION (Austin, TX). RNA was quantified by absorbance at A_{260/280} (the A_{260/280} ratio was >1.75). The integrity of the 28S and 18S ribosomal RNAs was verified by agarose formaldehyde gel electrophoresis followed by ethidium bromide staining and the 28S/18S ratio was greater than 2. The mRNA expression was assayed by quantitative real time RT-PCR (RT-qPCR) analysis. Equal amounts of DNA-free RNA from each sample were used for first-strand cDNA synthesis and the PCR reactions were performed using the SuperScript II Platinum Two- Step RT-qPCR Kit with SYBR Green (Invitrogen, Madrid, Spain) or TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA), according to the manufacturer's instructions and following the methodology previously described

[22-25]. The relative amount of mRNAs normalized expression was calculated using the comparative $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method.

Histological Analysis. Samples of muscle stored in buffered formaldehyde were embedded in paraffin. Sections (4 μ m) were stained with hematoxylin-eosin, observed with a Nikon microscope and images were captured. Morphometric analyses of fiber area were evaluated blindly using Scion Image software (Scion Corporation, Frederick, Maryland, USA).

Statistical Analysis. The results are expressed as means \pm SD. Comparisons were made using one-way ANOVA and Mann-Whitney *U*-test. Correlations between variables were sought using the Spearman's correlation tests. Kaplan-Meier analysis was performed to determine disease onset and survival time. All calculations were performed using SPSS version 15.0 software (SPSS, Chicago, IL). Significance was set at $P < 0.05$.

RESULTS

Increased cholesterol and diminished ROS levels in EVOO diet

The effects of the experimental diets on plasma lipid parameters in SOD1G93A mice are shown in Table 2. Mice consuming the high lipid diets showed increased plasma total cholesterol and APOA1 levels and no significant change in their plasma triglycerides. Neither did plasma APOA4 and APOB experience any significant change. The distribution of APOA1 and APOA4, cholesterol, phosphatidylcholine and sphingomyelin among the plasma lipoproteins analyzed by FPLC is shown in supplementary figure 1. No striking changes were observed in any of these parameters. Interestingly, the content of ROS in HDL was lower in animals consuming high fat diets and particularly in animals consuming EVOO (panel F).

EVOO diet prolongs the lifespan and improves the motor behavior of SOD1G93A mice

Statistical significant differences in survival rate were observed between chow and EVOO diet ($p < 0.05$) (figure 1A). Mice fed with a chow diet showed a mean

lifespan of 127.5 ± 4.47 days, whereas mice fed with an EVOO diet survived 142.87 ± 2.92 days. Moreover, disease onset of palm oil group (89.83 ± 2.15 days) was significant earlier than chow diet group (106.11 ± 3.94) or EVOO group (107.33 ± 6.68) (figure 1C).

According to the rotarod test (figure 2A), significant differences between chow diet and EVOO group were observed at P112 ($p < 0.05$). From P112 to P126, EVOO group mice showed better motor performance than control group. In contrast palm oil group showed early symptoms at P84 and significant differences from chow diet group were detected from P91 to P119 ($p < 0.05$, $p < 0.001$). Furthermore, palm oil group did not show any improvement in motor behavior from the beginning of the assay.

In relation to hanging-wire test (figure 2B), the motor symptoms appeared earlier in palm oil group (P84), although the decline began to be significant at P105 and continued until P133 ($p < 0.001$, $p < 0.01$, $p < 0.05$). No statistical significant differences were observed between chow and EVOO diet.

Taking together these results, the higher survival rate together with the significant improvement in motor behavior observed in EVOO-enriched diet mice, suggested that EVOO could diminish the muscle damage.

EVOO-enriched diet increase the muscle fiber area in SOD1G93A mice

In figure 3, panels A, B and C, representative images of muscle fibers coming from mice receiving the different diets are displayed. Animals receiving the palm diet showed a lesser size of muscle fibers. Quantitative analyses, shown in panel D, confirmed that this difference was statistically significant when compared to the mice receiving the EVOO-enriched diet.

EVOO diminishes ER stress through Atf6 and Grp78

In order to look for a potential ER stress involvement, the expression of the three described pathways was evaluated: Atf6, Ire1 and Perk. As shown in figure 5A, mice consuming EVOO showed significantly decreased levels of Atf6 expression compared to control and palm groups. The latter group showed significantly increased levels of Grp78 when compared to mice receiving the EVOO-containing diet. Analysis of correlation of both expressions, Atf6 and Grp78, showed a positive and significant value (figure 5C) suggesting a coordinate

regulation of this cascade of ER stress despite the different diets supplied. Conversely, Grp78 expression was negatively associated with area of fiber (figure 5D). On the other hand, Ire1 and Perk mRNA expressions (data not shown) did not show any significant change. Collectively, these data suggest that olive oil administration is improving ER stress through the Atf6 and Grp78 branch. Analysis of proliferating mitochondria marker, Pgc1a, revealed a significant decrease in palm-fed mice (0.7 ± 0.1) when compared to the control group (1.0 ± 0.2). No change was observed in mice receiving the EVOO diet (1.0 ± 0.5).

DISCUSSION

The present work describes a nutritional intervention with two high fat diets on an ALS mouse model where the nature of fat has a profound influence on the survival and motor behavior of the mice. To explain these findings, a study of muscle pathology has been carried out and provided a difference in muscle fiber area between both high fat diets. Furthermore, mRNA expression has evidenced that changes in expression of myogenic and reticulum stress genes are involved in the differential response between both high fat diets.

In an attempt to reproduce in mice the average intake of fat in humans of Western society, we provided animals with extra virgin olive oil or palm oil as 20% (w/w) of the diet, but deprived of dietary cholesterol, to reproduce the classical Mediterranean diet. A dietary pattern characterized by a high fat content, mainly derived from olive oil, and low cholesterol [14]. We have found that a dietary fat supplement of extra virgin olive oil, administered at a level comparable to that of human energy intake, resulted in an amelioration of ALS pathological findings and delay in their onset. These results are in agreement with the benefits observed using high fat diets [6, 8], but it adds a new aspect regarding the nature of fat used. The use of EVOO was clearly more beneficial in SOD1G93A mice than that of palm oil. In this regard, two aspects are different: the higher supply of palmitic acid and the decrease of oleic acid in the latter oil. These two components have been observed to behave differently. In particular, oleate has been found to prevent palmitic-induced insulin resistance, inflammation [26] and endoplasmic reticulum stress [27] in cultured muscle cells.

Our data of animals receiving EVOO clearly indicate a decrease of endoplasmic reticulum stress markers, *Atf6* and *Grp78* but not *Ire1* and *Perk*, when compared with animals receiving palm oil (Figure 5). The unfolded protein response (UPR) through signal transduction pathways transfers information about protein folding status in the ER. It is mainly executed by three distinct signal cascades involving inositol requiring (IRE1), PKR-like ER kinase (PERK), and activating transcription factor (*Atf6*) [28] and may participate in the pathogenesis of ALS [29]. The present results suggest that the *Atf6* network is differentially expressed in this dietary trial in agreement with the changes in *Grp78* that detects the accumulation of misfolded proteins in the ER and collaborates with *Atf6* [28]. PGC-1alpha has been considered as a novel and clinically relevant disease modifier of human and experimental ALS [30]. In our results, the supplement of palm oil also decreased the expression of this mitochondrial proliferation marker. Overall, our results indicate that both ER and mitochondria are important contributors to the muscle cell fitness in ALS. This is in agreement with the proposed network connecting the sarcomere integrity to mitochondrial oxidative metabolism [31], and the important role of skeletal muscle as a primary target of muscle atrophy [10] and of ALS toxicity [10, 32, 33].

Following with the neurodegenerative conditions observed in ALS, the loss of motor neuron connections in the neuromuscular junction is likely due to an energetic deficit in the mutant muscle that leads to pathological conditions [22]. In this regard, the present work proposes a dietary intervention to correct this deficit. Interestingly, mice receiving EVOO-enriched diet significantly survived 15 days longer than control animals, although no significant differences were found in the onset of symptoms. In addition to this longer lifespan observed in animals receiving the EVOO-enriched diet, the motor coordination and balance of these treated mice improved along disease progression over mice fed a chow diet. Nevertheless, mice receiving palm oil-enriched diet showed shorter mean survival of 4 days, significant earlier disease onset (Figure 1) and a significant lower motor coordination compared to control mice along the disease progression (Figure 2). Moreover, the neuromuscular strength in EVOO-enriched diet mice resembled the one observed in control group while this strength was significantly and progressively declined in palm-oil enriched diet mice until the terminal stage (Figure 2). Overall, these data are suggesting that EVOO diets displayed general

benefits when compared to control group and specific ones when compared to palm-enriched diets, and that not all high-fat diets may have the same outcome. Clinical trials carried out in patients have addressed the influence of hypercaloric diets by comparing carbohydrates versus fat [34]. In this trial, source of fat was a commercial formula containing marine and borage oils and was found safe. A second trial, NCT01016522 (www.clinicaltrials.gov/), has been conducted to evaluate the safety of ketogenic diets in ALS patients using a commercial formula as well. In these settings, our results may provide guidance for improving these human interventions.

Interestingly, a recent study focused on the role of SOD1 in the ER stress response suggested that SOD1 could act as a switch to prompt the ER stress response through its binding to the cytosolic carboxyl-terminal of Derlin-1, a component of the ER-associated degradation machinery [29]. In particular, the binding of mutant SOD1 to Derlin-1 could trigger ER stress through the disruption of the ER-associated degradation machinery and therefore could contribute to motor neuron death [29]. Taking into consideration the higher and significant survival rate in EVOO-enriched diet mice together with the significant improvement of their behavior function over palm oil-enriched diet mice, our results suggested that EVOO-enriched diet could ameliorate the ER stress response induced by mutant SOD1 expressed in mice. This would agree with the *in vitro* protection of endoplasmic reticulum stress observed for the main phenolic compound of EVOO, hydroxytyrosol [35].

According to these results and taking into consideration that skeletal muscle is one of the main targets of the disease, our previous studies in this tissue suggested a deregulation of different genetic biomarkers along disease progression [22, 23]. Consequently the next step forward in our study was focused on the analysis of genetic biomarkers' expression in the skeletal muscle of SOD1G93A mice fed a standard chow diet, EVOO or palm-enriched diet. For this purpose we tested the expression levels of seven genes related to the skeletal myogenesis and integrity, *Pax7*, *Myod1*, *Myf5*, *Myog*, *Rrad*, *Chrna1* and *Col19a1* (Figure 4). A significant increase of *Myod1*, *Myog* and *Chrna1* was observed in palm oil-enriched diet mice, whereas in EVOO-enriched diet mice, the expression levels of the tested genes tended to reach control levels. Furthermore, an upregulation of the myogenic regulatory factors, such as *Myod1* and *Myog*, was

previously found coincident with increase muscle damage and denervation markers *Rrad* and *Chrna1* respectively [23], in the same animal model. This result suggested that palm oil-enriched diet would favor skeletal myogenesis in a greater extent than in EVOO-enriched diet mice. In addition, palm oil-enriched diet mice showed a significant upregulation of *Col19a1* compared to EVOO group and in a setting of ER stress. It is known that a downregulation of the *Col19a1* expression in skeletal biopsy samples of SOD1G93A mice correlated inversely with longevity [22], suggesting that the survival rate of animals that overexpressed this gene was lower than the observed in animals in which this expression was found downregulated. This result was coincident with the higher survival rate observed in mice receiving EVOO-enriched diet. Therefore in our study, the significant upregulation of *Myod1*, *Myog*, *Chrna1* and *Col19a1* in mice fed palm oil-enriched diet suggests that the latter diet could not compensate muscle damage as efficiently as the EVOO-enriched diet. In fact, EVOO-enriched diet diminishing ER stress was accompanied by an amelioration of muscle damage (Figure 3).

In clear connection with ER homeostasis, autophagy and ER are in a reciprocal interaction since autophagy activation can be regulated by ER Ca²⁺ stores [36]. It has been also reported that the SOD1G93A expression is sufficient to induce muscle atrophy associated with oxidative stress through activation of the autophagy [10]. Furthermore, the autophagy, process that leads to the degradation of cytoplasmatic components inside lysosomes, also participate in mutant SOD1 clearance in muscle cells combined with the proteasome activity [37]. It has been described that certain olive oil's components can modify proteolysis [38], so the EVOO-enriched diet may influence the autophagy process in our experimental approach. To this purpose, we have tested two markers of autophagy,

LC3 and *Beclin1*, which are essential for autophagosome formation; in particular, *LC3* is used to monitor autophagy processes [39]. Our previous experiments suggested that the expression of *LC3* and *Beclin1* was increased at terminal stages in muscle of SOD1G93 mice (data not shown). Here we found that EVOO-enriched diet not only induced a significantly downregulation of the expression of *LC3* and *Beclin1* genes (Figure 4C) but also increased the fiber area (Figure 3).

Therefore, these results indicate lower muscle atrophy in these mice and suggest that the EVOO treatment showed protective effects in the muscle.

In conclusion, our results establish an important role for quality of fat on the progression of ALS in SOD1G93A mice. In addition, they provide new insights on the molecular pathways influencing neurodegenerative progression and may contribute to emphasize the relevance of Mediterranean diet in this pathology. Although our findings from mice may not be directly applicable to humans, their relevance is particularly important considering the devastating progression of the disease and the high security of the nutritional intervention proposed.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by grants *Ministerio de Ciencia e Innovación* INNPACTO IPT-2011-1091-900000, *Fondo de Investigación Sanitaria* of Spain (PI10/0178), ALS association (ALSA) #S54406, FEDER-CICYT (SAF2010-14958), *Gobierno de Aragón* (PI025/08) and *Redes DGA* (B-69). CIBER is an initiative of the FEDER-*Instituto de Salud Carlos III*, Madrid, Spain. We thank to Pilar Lierta and Silvia Garcés from *Unidad Mixta de Investigación* for their invaluable help in maintaining animals and Rosario Puyó for her technical assistance.

REFERENCES

- [1] Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*. 1993;362:59-62.
- [2] Deng HX, Hentati A, Tainer JA, Iqbal Z, Cayabyab A, Hung WY, et al. Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase. *Science*. 1993;261:1047-51.
- [3] Barber SC, Mead RJ, Shaw PJ. Oxidative stress in ALS: a mechanism of neurodegeneration and a therapeutic target. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1762:1051-67.
- [4] Ripps ME, Huntley GW, Hof PR, Morrison JH, Gordon JW. Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:689-93.
- [5] Barbeito AG, Mesci P, Boillee S. Motor neuron-immune interactions: the vicious circle of ALS. *J Neural Transm*. 2010;117:981-1000.
- [6] Dupuis L, Oudart H, Rene F, Gonzalez de Aguilar JL, Loeffler JP. Evidence for defective energy homeostasis in amyotrophic lateral sclerosis: benefit of a high-energy diet in a transgenic mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:11159-64.
- [7] Fergani A, Oudart H, Gonzalez De Aguilar JL, Fricker B, Rene F, Hocquette JF, et al. Increased peripheral lipid clearance in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Lipid Res*. 2007;48:1571-80.
- [8] Mattson MP, Cutler RG, Camandola S. Energy intake and amyotrophic lateral sclerosis. *Neuromolecular Med*. 2007;9:17-20.
- [9] Pedersen WA, Mattson MP. No benefit of dietary restriction on disease onset or progression in amyotrophic lateral sclerosis Cu/Zn-superoxide dismutase mutant mice. *Brain Res*. 1999;833:117-20.
- [10] Dobrowolny G, Aucello M, Rizzuto E, Beccafico S, Mammucari C, Boncompagni S, et al. Skeletal muscle is a primary target of SOD1G93A-mediated toxicity. *Cell Metab*. 2008;8:425-36.
- [11] Martinez-Gonzalez MA, Sanchez-Villegas A, De Irala J, Marti A, Martinez JA. Mediterranean diet and stroke: objectives and design of the SUN project. *Seguimiento Universidad de Navarra. Nutr Neurosci*. 2002;5:65-73.
- [12] Scarmeas N, Luchsinger JA, Schupf N, Brickman AM, Cosentino S, Tang MX, et al. Physical activity, diet, and risk of Alzheimer disease. *JAMA*. 2009;302:627-37.
- [13] Estruch R, Ros E, Salas-Salvado J, Covas MI, Corella D, Aros F, et al. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *N Engl J Med*. 2013;368:1279-90.
- [14] Lopez-Miranda J, Perez-Jimenez F, Ros E, De Caterina R, Badimon L, Covas MI, et al. Olive oil and health: summary of the II international conference on olive oil and health consensus report, Jaen and Cordoba (Spain) 2008. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2010;20:284-94.
- [15] Guillen N, Acin S, Navarro MA, Surra JC, Arnal C, Lou-Bonafonte JM, et al. Knowledge of the biological actions of extra virgin olive oil gained from mice lacking apolipoprotein E. *Rev Esp Cardiol*. 2009;62:294-304.

- [16] Calleja L, Paris MA, Paul A, Vilella E, Joven J, Jimenez A, et al. Low-cholesterol and high-fat diets reduce atherosclerotic lesion development in ApoE-knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:2368-75.
- [17] Boillee S, Yamanaka K, Lobsiger CS, Copeland NG, Jenkins NA, Kassiotis G, et al. Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science.* 2006;312:1389-92.
- [18] Navarro MA, Carpintero R, Acin S, Arbones-Mainar JM, Calleja L, Carnicer R, et al. Immune-regulation of the apolipoprotein A-I/C-III/A-IV gene cluster in experimental inflammation. *Cytokine.* 2005;31:52-63.
- [19] Martinez-Beamonte R, Navarro MA, Acin S, Guillen N, Barranquero C, Arnal C, et al. Postprandial changes in high density lipoproteins in rats subjected to gavage administration of virgin olive oil. *PLoS One.* 2013;8:e55231.
- [20] Calvo AC, Manzano R, Atencia-Cibreiro G, Olivan S, Munoz MJ, Zaragoza P, et al. Genetic biomarkers for ALS disease in transgenic SOD1(G93A) mice. *PLoS One.* 2012;7:e32632.
- [21] Manzano R, Toivonen JM, Olivan S, Calvo AC, Moreno-Igoa M, Munoz MJ, et al. Altered expression of myogenic regulatory factors in the mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegener Dis.* 2011;8:386-96.
- [22] Nuno-Ayala M, Guillen N, Navarro MA, Lou-Bonafonte JM, Arnal C, Gascon S, et al. Cysteinemia, rather than homocysteinemia, is associated with plasma apolipoprotein A-I levels in hyperhomocysteinemia: lipid metabolism in cystathionine beta-synthase deficiency. *Atherosclerosis.* 2010;212:268-73.
- [23] Ramirez-Torres A, Barcelo-Batlloiri S, Martinez-Beamonte R, Navarro MA, Surra JC, Arnal C, et al. Proteomics and gene expression analyses of squalene-supplemented mice identify microsomal thioredoxin domain-containing protein 5 changes associated with hepatic steatosis. *J Proteomics.* 2012;77:27-39.
- [24] Coll T, Eyre E, Rodriguez-Calvo R, Palomer X, Sanchez RM, Merlos M, et al. Oleate reverses palmitate-induced insulin resistance and inflammation in skeletal muscle cells. *J Biol Chem.* 2008;283:11107-16.
- [25] Salvado L, Coll T, Gomez-Foix AM, Salmeron E, Barroso E, Palomer X, et al. Oleate prevents saturated-fatty-acid-induced ER stress, inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cells through an AMPK-dependent mechanism. *Diabetologia.* 2013;56:1372-82.
- [26] Ozcan L, Tabas I. Role of endoplasmic reticulum stress in metabolic disease and other disorders. *Annu Rev Med.* 2012;63:317-28.
- [27] Homma K, Fujisawa T, Tsuburaya N, Yamaguchi N, Kadowaki H, Takeda K, et al. SOD1 as a Molecular Switch for Initiating the Homeostatic ER Stress Response under Zinc Deficiency. *Mol Cell.* 2013.
- [28] Eschbach J, Schwalenstocker B, Soyal SM, Bayer H, Wiesner D, Akimoto C, et al. PGC-1alpha is a male-specific disease modifier of human and experimental amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet.* 2013;22:3477-84.
- [29] Bernardini C, Censi F, Lattanzi W, Barba M, Calcagnini G, Giuliani A, et al. Mitochondrial network genes in the skeletal muscle of amyotrophic lateral sclerosis patients. *PLoS One.* 2013;8:e57739.
- [30] Dupuis L, Loeffler JP. [Amyotrophic lateral sclerosis: role of energy deficiency in neuromuscular junction dismantlement]. *Med Sci (Paris).* 2008;24:1077-82.
- [31] Musaro A. State of the art and the dark side of amyotrophic lateral sclerosis. *World J Biol Chem.* 2010;1:62-8.

- [32] Decuypere JP, Paudel RC, Parys J, Bultynck G. Intracellular Ca signaling: A novel player in the canonical mTOR-controlled autophagy pathway. *Commun Integr Biol.* 2013;6:e25429.
- [33] Onesto E, Rusmini P, Crippa V, Ferri N, Zito A, Galbiati M, et al. Muscle cells and motoneurons differentially remove mutant SOD1 causing familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem.* 2011;118:266-80.
- [34] Katsiki M, Chondrogianni N, Chinou I, Rivett AJ, Gonos ES. The olive constituent oleuropein exhibits proteasome stimulatory properties in vitro and confers life span extension of human embryonic fibroblasts. *Rejuvenation Res.* 2007;10:157-72.
- [35] Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell.* 2010;140:313-26.

Table 1. Composition of the experimental diets provided to mice.

| | Chow | Extra virgin olive l | Palm oil |
|-------------------------------------|------|----------------------|----------|
| Energetic Content (kJ/g) | 13 | 18 | 18 |
| Carbohydrate | 57 | 51 | 51 |
| Protein | 16 | 12 | 12 |
| Fat | 3 | 22 | 22 |
| Vitamin E (UI %) | 10 | 22 | 21 |
| Cholesterol (mg %) | 30 | 25 | 25 |
| Fatty acids, | | | |
| Lauric (12:0) | 0.1 | 0.1 | 0.1 |
| Myristic (14:0) | 0.02 | 0.0 | 0.0 |
| Palmitic (16:0) | 15.8 | 15.0 | 20.7 |
| Margaric (17:0) | 0.2 | 0.2 | 0.2 |
| Stearic (18:0) | 1.7 | 1.7 | 2.4 |
| Arachidic (20:0) | 0.1 | 0.2 | 0.2 |
| Behenic (22:0) | 0.02 | 0.0 | 0.0 |
| Lignoceric (24:0) | 0.1 | 0.1 | 0.1 |
| Palmitoleic (16:1) | 0.02 | 0.2 | 0.0 |
| Oleic (18:1) | 20.1 | 31.5 | 24.3 |
| Gadoleic (20:1) | 0.4 | 0.4 | 0.3 |
| Linoleic (18:2n-6) | 57.9 | 47.7 | 48.7 |
| Linolenic (18:3n-3) | 3.5 | 2.9 | 2.9 |
| Saturated | 18.0 | 17.3 | 23.7 |
| Monounsaturated | 20.5 | 32.1 | 24.7 |
| Polyunsaturated | 61.4 | 50.6 | 51.6 |
| P/S ratio | 3.4 | 2.9 | 2.2 |
| Total phenolic compounds (mg/kg) | 0.1 | 45 | 2 |

Dietary components are expressed as % (w/w). Other components of the chow diet are crude fiber 4.5 % and minerals 6.8 %. A total dry matter of 87.5%. P/S ratio = polyunsaturated / saturated fatty acid ratio.

Table 2. Plasma lipid parameters following the different experimental diets

| | Control (n=11) | EVOO (n=12) | Palm (n=6) |
|---------------------------|-------------------|-----------------------|-----------------------|
| APOA1 (AU/L) | 76 ± 9 | 87 ± 8 ^a | 92 ± 8 ^a |
| APOA4 (AU/L) | 3.8 ± 1.1 | 5.5 ± 1.6 | 5.8 ± 1.0 |
| APOB (AU/L) | 0.5 ± 1.0 | 0.6 ± 1.0 | 0.9 ± 1.0 |
| Total cholesterol (mg/dL) | 100 ± 7 | 112 ± 11 ^a | 124 ± 13 ^b |
| Triglycerides (mmol/L) | 0.4 ± 0.1 | 0.5 ± 0.3 | 0.5 ± 0.2 |

Values are means ± standard deviations. Mice were fed chow or experimental diets for 8 weeks and fasted 4 hours before blood sampling. Statistical analysis was done using non-parametric one-way ANOVA according to Kruskal-Wallis test and unpaired Mann-Whitney U-test as post-hoc test. Different superscripts (^a vs Control, ^b vs EVOO) are significantly different from each other at P < 0.05.

Figure 1. Survival and disease symptom onset of SOD1G93A mice. Kaplan-Meier analysis of survival (A) and clinical symptom onset (B) revealed significant differences between the diets. Mice fed an EVOO diet showed a higher and significant survival than control mice ($p < 0.05$) whereas disease symptom onset occurred significantly earlier in palm oil group ($p < 0.05$) (C). $n = 10$ mice per group.

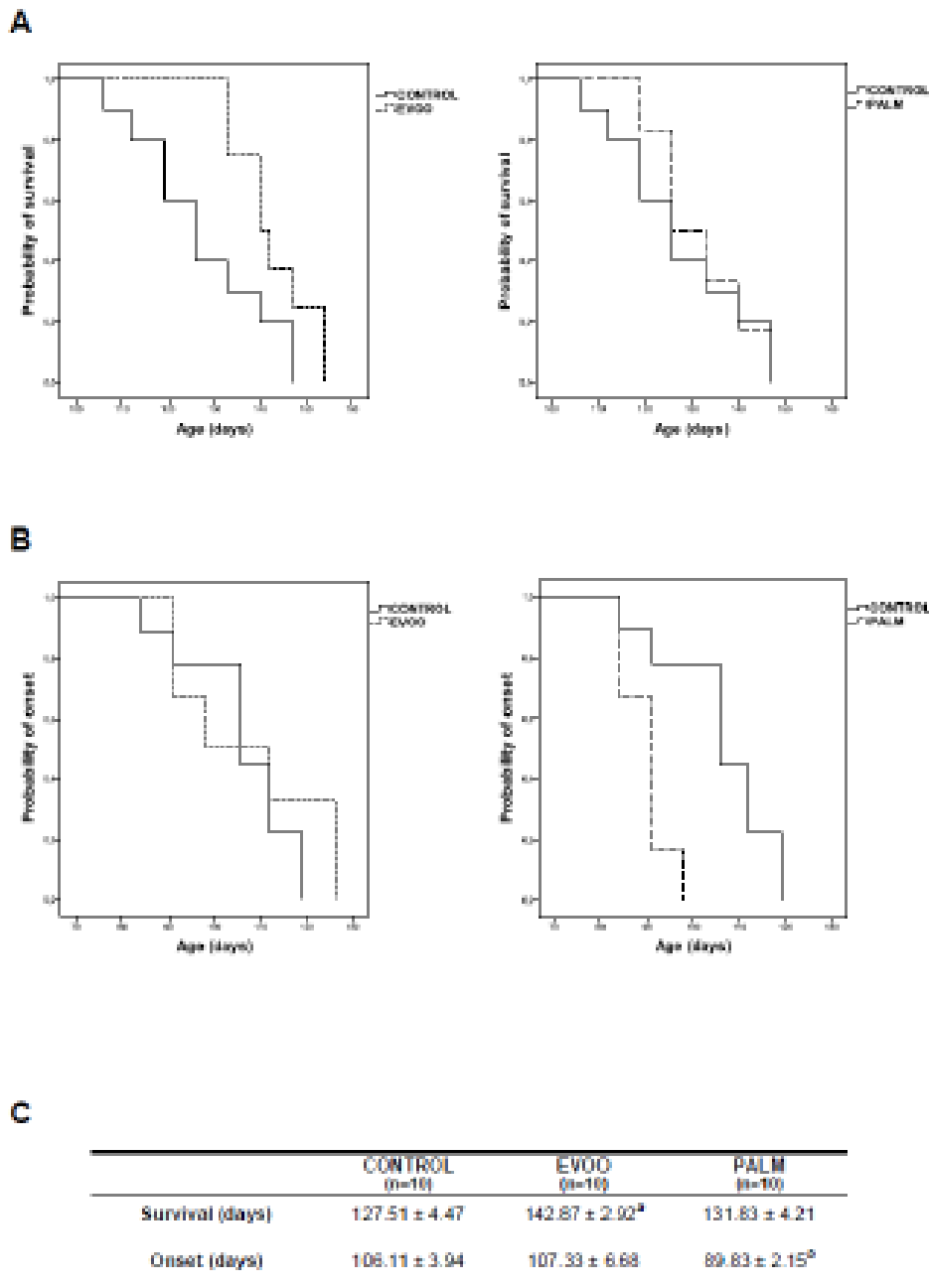
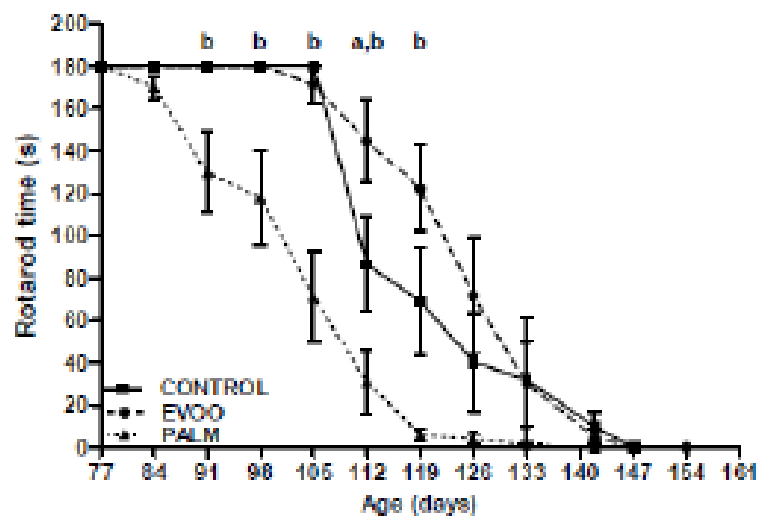


Figure 2. Effect of different diets on the progression of the disease of SOD1G93A mice. Motor performance was evaluated by rotarod (A) and hanging-wire (B) tests. Data are shown as mean \pm SEM. Student's *t*-test was performed to compare control and treatment groups ($n=10$): a, $p<0.05$ (EVOO vs control group) and b, $p<0.05$ (palm oil vs control group).

A



B

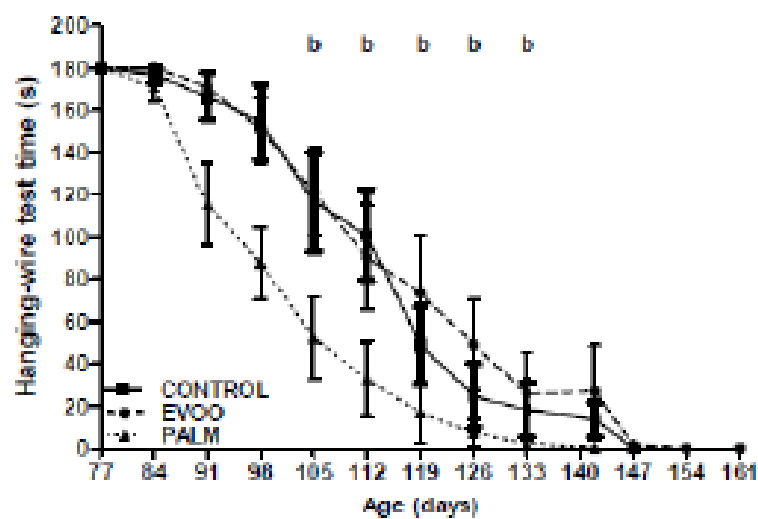


Figure 3. Cross-sectional analyses of muscular fibers. Panels A, B and C correspond to representative images coming from mice receiving control, EVOO and Palm diets, respectively. Panel D summarizes fiber areas in SOD1G93A mice following different the experimental diets. Data are mean \pm SD for each group. Statistical analysis was done using non-parametric one-way ANOVA according to Kruskal-Wallis test and unpaired Mann-Whitney U-test as post-hoc test. ^b, $p < 0.05$ vs EVOO.

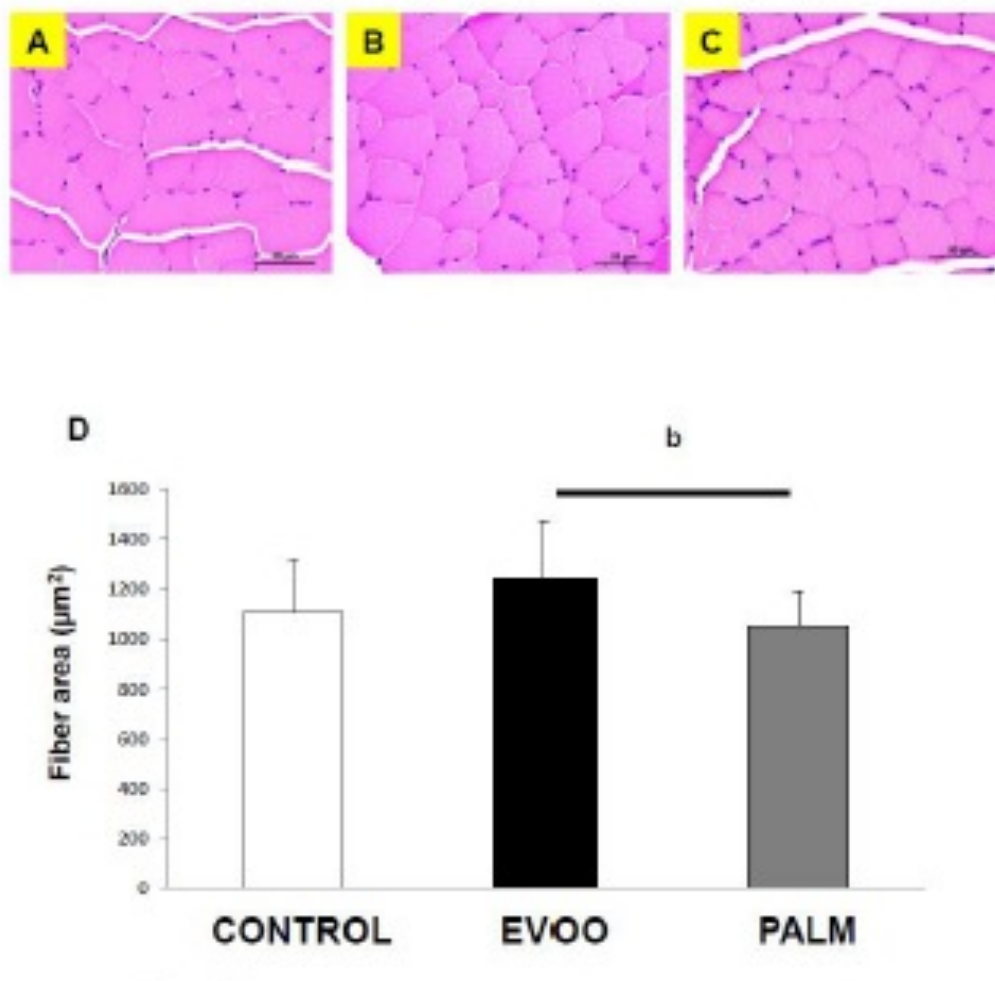


Figure 4. Gene expression of myogenic regulatory factors (MRFs), biomarkers of disease progression and autophagy in skeletal muscle of SOD1G93A mice.

Relative expression levels of MRF (A), biomarkers of disease progression (B) and autophagy (C) compared between mice fed a chow, EVOO and palm oil diet (n=5). Values are means \pm standard deviations. Student's *t*-test: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

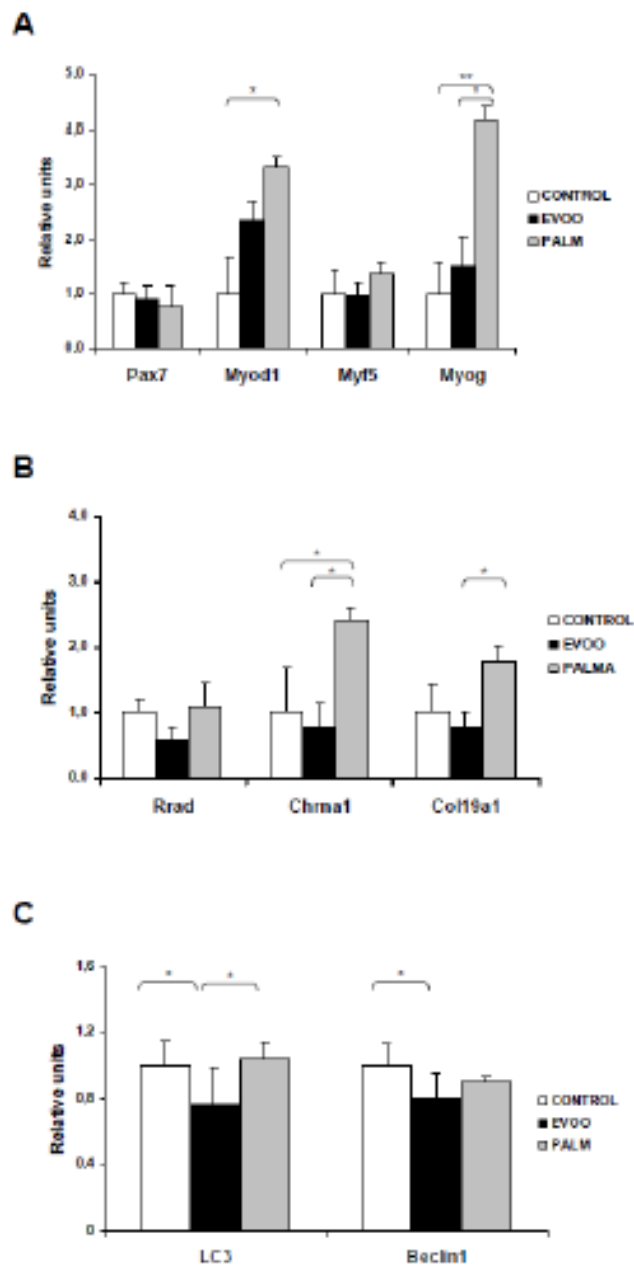
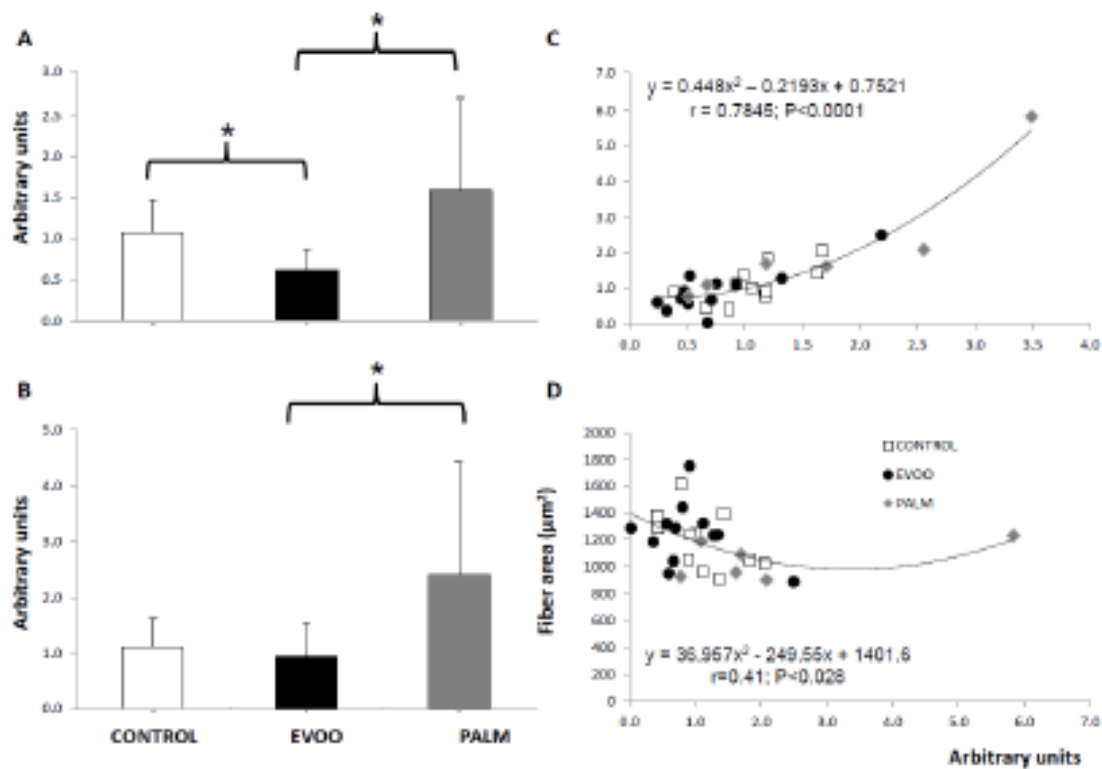


Figure 5. Reticulum stress marker expressions in the different experimental conditions. A, Atf6 and B, Grp78 mRNA expressions, respectively. Values are means \pm standard deviations. Unpaired Mann-Whitney U-test as post-hoc test. * $p < 0.05$. Panel C, relationship between Atf6 and Grp78 expressions. Panel D, relationship between muscle fiber area and Grp78 expressions. Correlation was calculated according to Spearman's test. Values corresponding to all experimental groups have been included, where empty, black squares and grey diamonds correspond to chow, EVOO- and palm oil-containing diets, respectively.



5.5 MANUSCRITO 5

The interplay between defective autophagy and proteasome activation in SOD1G93A mice spinal cord

Oliván S, Calvo AC, Herrera M, Zaragoza P, Osta R

En preparación

ABSTRACT

One of the very well-known motor neuron diseases, Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS), is characterized by a selective loss of motor neurons together with a progressive muscle weakness. Several molecular mechanisms have been associated with the neurodegenerative progression in ALS to find a potential cause of the disease. In particular, the two main intracellular degradation mechanisms, autophagy and the ubiquitin-proteasome degradative system (UPS) have been mainly studied in one of the most vulnerable tissue, the spinal cord. In this study we investigated the interplay between autophagy and the proteasome in the spinal cord from transgenic SOD1G93A male and female mice along disease progression. Our results showed a significant deficient autophagy in transgenic SOD1G93A male and female mice, while the proteasome activation was found at the terminal stage, since chloroquine treatment revealed the upregulated levels of LC3-II and p62 found at late stages in transgenic females and at symptomatic stages in transgenic males, were indicative of an autophagy blockage. The mRNA deregulated levels of *LC3*, *p62*, *Beclin1*, *Atg5* and *E2f1* were observed at early symptomatic, symptomatic and terminal stages in both transgenic males and females, which reinforced the impairment of autophagy along disease progression. The combined data provided clear evidence for the first time that the defective autophagy favoured the proteasome activation at late stages of the disease in the spinal cord from transgenic SOD1G93A males and females. These findings could represent a new approach for potential therapeutic treatments.

Keywords: autophagy, gender, LC3, spinal cord, transgenic SOD1G93A mice, UPS

Abbreviations: ALS, Amyotrophic Lateral Sclerosis; CQ, chloroquine; ER, endoplasmic reticulum; fALS, familial ALS; LC3, microtubule-associated protein 1 light chain; P, postnatal day; PBS, phosphate-buffered saline; sALS, sporadic ALS; SEM, standard error of the mean; UPR, unfolded protein response; UPS, ubiquitin-proteasome degradative system.

INTRODUCTION

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a fatal progressive disease in which the weakness of the voluntary muscles and the motor neuron degeneration is present. The two forms of the disease, familial and sporadic ALS (fALS and sALS) are still opening new questions to definitely find the main cause of ALS. Indeed, several mechanisms of motor neuron degeneration have been proposed since spinal cord is one of the most vulnerable tissues in the disease. As an example, calcium and glutamate-mediated cytotoxicity, mitochondrial dysfunction, neurofilament disorganization, blockage in retrograde transport have been widely described.¹ More recently, new insights into degradative systems are shedding a light on the complex connection between the accumulation of the misfolded or abnormal proteins and the disease progression.² Indeed, the spinal cord tissue is especially vulnerable to this abnormal protein aggregates. Therefore, the fine tune between autophagy and the ubiquitin-proteasome degradative system (UPS) becomes necessary to maintain an adequate homeostasis in the tissue.

Autophagy and the proteasome system can regulate different cellular mechanisms to protect cells from the deleterious effect of mutant and misfolded proteins in basal conditions. The proteasome activity is mainly focused on the degradation of short peptides and as a consequence, it is more selective than autophagy, which is associated with lysosomes and comprises three different and subtle mechanisms of action: microautophagy, macroautophagy, and chaperone mediated autophagy.^{2,3} Under a neurodegenerative scenario, such as ALS, the equilibrium between these two degradative systems is essential. In fact, in many neurodegenerative disorders has been described that the impairment of one of these systems can prompt the activation of the other. Remarkably, a wide range of studies have characterized the possible cause of autophagy impairment in different experimental models for ALS.⁴⁻¹² In addition, mutant SOD1 aggregates not only induce impairment in proteasome activity but also alterations in SOD1 intracellular distribution.¹³ However, the deregulation of the main molecular markers of autophagy and the proteasome, especially in spinal cord tissue, remain controversial.

Recent studies suggested that an autophagy activation could play a relevant role in the delay of the neurodegenerative progression in ALS and the right interplay between autophagy and the proteasome could compensate for the impairment of one of them.¹⁴ On the contrary, the lack of a compensatory effect between these mechanisms could lead to an accumulation of misfolded or abnormal proteins and a blockage of the autophagic flux.¹⁵ Interestingly, an autophagy impairment has been shown at the presymptomatic stage in transgenic mice, although it is not well understood whether this impairment is due to an activation or to a blockage of autophagy process.¹⁶ On the other hand, taking into consideration the effect of a wide range of drugs in the autophagy process, an autophagy activation could rescue motor neurons from excitotoxicity mediated by misfolded or aberrant proteins in transgenic SOD1 mice, which reinforce the notion of the protective role of autophagy activation.¹⁷⁻²⁴

Regarding constitutive autophagy, we have shown in previous studies sex and tissue specific differences in spinal cord and skeletal muscle tissues from transgenic SOD1G93A mice.²⁵ Our next step forward in this study was to investigate the role of autophagy and the proteasome in the spinal cord from transgenic SOD1G93A mice, analyzing transgenic males and females independently to accurately monitor these systems along disease progression and to avoid sex bias. Our results revealed a novel finding about the autophagy deficiency in both transgenic males and females and the relevant role of the proteasome at the late stage of the disease in this tissue, paving the way to potential therapeutic strategies for the disease.

RESULTS

mRNA impairment of autophagy markers along disease progression. Sex differences in the mRNA expression pattern of autophagy markers along disease progression were evaluated in the transgenic SOD1G93A mice. mRNA expression levels of *LC3*, *p62*, *Beclin1*, *Atg5* and *E2f1* genes were quantified by real-time PCR in spinal cord samples of wild type and transgenic SOD1G93A mice along disease progression (Figure 1). At early symptomatic stage (P60), significant

downregulated levels of *LC3* and *p62* were observed in transgenic SOD1G93A males, while in transgenic SOD1G93A females, downregulated levels of *LC3*, *Atg5* and *E2f1* were also registered.

At symptomatic stage (P90) in transgenic SOD1G93A males, mRNA levels of *LC3* and *p62* were still significantly downregulated. However, *Atg5* mRNA levels started to be upregulated. This upregulation was still evident at terminal stage (P120) but no statistically significant. Only in the case of *p62* and *Beclin1* the upregulated levels were significant at this late stage of the disease (Figure 1a).

At symptomatic stage (P90) in transgenic SOD1G93A females, in spite of the significant downregulation found in *Atg5* mRNA levels, increased levels of *LC3* and *Beclin1* were observed. However, at terminal stage (P120), only *Atg5* mRNA levels were significant upregulated, and a downregulation of *LC3* and *E2f1* levels were registered (Figure 1b).

Uncoupled upregulation of LC3-II and p62 protein levels in transgenic males and females. To study in depth the autophagy impairment at translational level, we analyzed the protein expression levels of two widely used autophagy markers, LC3-II and p62 along disease progression (Figure 2). This analysis showed that no parallel variation of these two markers was found in both genders, in each stage of the disease (Figure 2a).

In transgenic SOD1G93A males, at early and symptomatic stages of the disease, significant upregulated protein levels of LC3-II were found and only at terminal stage (P120) LC3-II levels decreased significantly below wild-type average. Interestingly, in transgenic SOD1G93A females, at early symptomatic stage (P60) LC3-II levels were upregulated, while in the symptomatic stage (P90), earlier than in transgenic males, these levels decreased significantly (Figure 2a).

Furthermore, in transgenic SOD1G93A males, downregulated p62 levels were observed at asymptomatic and terminal stages. However, a more prolonged downregulation of p62 was observed in transgenic females till the terminal stage, when a significant upregulation was then registered (Figure 2a). These results suggested that autophagy seemed to be blockaded in transgenic males, while in transgenic females, the significant upregulation of p62 could suggest an activation or a blockage of autophagy. In order to clarify this point, the autophagic flux was assessed in females at P120 (Figure 2b). Treatment of spinal

cord extracts from transgenic female mice with chloroquine, an agent that impairs lysosomal acidification, showed no differences in LC3-II expression levels. This result could indicate a blockage instead of an activation of the autophagic flux (Figure 2b).²⁶

Activation of proteasomal activity at the late stages of the disease. Given the lack of an evident activation of autophagy along disease progression, we further investigated whether autophagy impairment influenced proteasomal activation at any stage of the disease, since the two main intracellular degradation mechanisms are the autophagy and the proteasome system. Therefore, in order to shed light on this question, we measured the activity of the 20S proteolytic component of the 26S proteasome in the spinal cord of transgenic males and females to even study whether the possible alteration in proteasomal activity could be gender-dependent (Figure 3).

In transgenic SOD1G93A males, the proteasomal activity was significantly upregulated at asymptomatic (P40) and terminal stages (P120), while a downregulated activity was found at symptomatic stage (P90). Interestingly, in transgenic SOD1G93A females, the proteasomal activity impairment was similar at symptomatic and terminal stages (P90 and P120), while contrary to the result found in transgenic males, a downregulation was found at asymptomatic stage.

DISCUSSION

The right connection between autophagy and the ubiquitin-proteasome degradative system is an essential need in tissues that become a main target of the neurodegenerative progression of diseases such as ALS. In this regard, motor neuron dysfunction in spinal cord has been very well described in sporadic and familial ALS (sALS and fALS).²⁷ In fact, accumulation of cytoplasmic aggregates in degenerating motor neurons in ALS can contribute to an autophagy and UPS impairment.^{10,11} Although autophagy and UPS were believed to participate independently in protein clearance, the fine tuning between these two processes has been shown, especially in ALS. Recent evidence that defective

proteasomal activity results in an activation of autophagy machinery, supports this notion.²⁸⁻³⁰

In this study, we further investigated the close link between autophagy and the UPS in the spinal cord tissue from transgenic SOD1G93A mice. To accurately monitor these two processes in this animal model for ALS, we analyzed transgenic males and females independently since autophagy can be influenced by gender differences.²⁵ To this purpose, we first evaluated the mRNA levels of five well-known markers of autophagy, *LC3*, *p62*, *Beclin1*, *Atg5* and *E2f1* along disease progression. Interestingly, in transgenic SOD1G93A males downregulated levels of *LC3* and *p62* were observed at early symptomatic (P60) and symptomatic (P90) stages, which suggested an autophagy blockage in the first stages of the disease. Furthermore, the upregulation found in *Atg5* and *Beclin1* levels at symptomatic (P90) and terminal (P120) stages could not be sufficient enough to prompt the activation of *LC3*, in spite of the upregulated *p62* levels at terminal stage. This result was in accordance with the fact that accumulation of *p62*, under defective autophagy, could favour neurodegeneration. Indeed, *p62* is a shuttle molecule in both autophagy and the proteasome, therefore deregulation of *p62* might account for pathological pathways in ALS.^{10,11,31}

Regarding transgenic SOD1G93A females, deregulated levels of *LC3* were observed at early symptomatic (P60) and terminal (P120) stages, while a significant upregulation was found at symptomatic stage (P90). However, mRNA *p62* levels did not varied significantly along disease progression, reaching wild type levels. This result might suggest that autophagy activation could be prompted at symptomatic stage, mainly favoured by the upregulation of *Beclin1*, which participates in the induction of the phagophore and in the formation of a functional autophagosome.¹⁰ Notwithstanding, the downregulated *Atg5* levels found at symptomatic stage did not suggest this point. In addition, the downregulated *E2f1* and *Atg5* levels at early symptomatic stage (P60) also pointed out to an autophagy blockage in the first stages of the disease in transgenic females. In connection with this result, at terminal stage (P120), upregulated *Atg5* levels did not correlated with *LC3* and *E2f1* levels, which were found downregulated, suggesting that an autophagy blockage might be also present in transgenic females at mRNA level.

Following with the autophagy deregulation in spinal cord along disease progression in transgenic male and female mice, we next examined the protein expression levels of the two main markers of the autophagic flux, LC3, which is associated with the autophagosome formation when the autophagy is activated, and p62, an adaptor molecule that participates in the insertion of ubiquitinated misfolded proteins into the autophagosomes. Taking into consideration the results observed at mRNA level, we expected a gender-dependent deregulation of the protein levels of these two markers along disease progression. In fact, a deficiency in autophagy causes neurodegeneration and therefore its activation could play an important protective role, as it has been previously described in the same animal model.⁴

In transgenic SOD1G93A males, we observed an upregulation in LC3-II protein levels at asymptomatic (P40), early symptomatic (P60) and symptomatic stages (P90), while at the terminal stage (P120), LC3-II levels decreased significantly below wild type average. Interestingly, downregulated p62 levels were found at asymptomatic (P40) and terminal (P120) stages, suggesting its defective role as a pivotal molecule to clear protein accumulation by autophagy and the proteasome, favouring neurodegeneration. In connection with p62 levels, the accumulation of LC3-II at the first stages of the disease could reinforce an autophagy blockage, which was in accordance with previous studies that showed increased levels of LC3-II started at symptomatic stage in transgenic SOD1G93A mice.^{16,32}

In contrast, in transgenic SOD1G93A females, we only observed an upregulation in LC3-II levels at early symptomatic stage (P60), while downregulated levels were found in the next symptomatic stage (P90). Similarly, downregulated protein levels of p62 were observed at asymptomatic (P40), early symptomatic (P60) and symptomatic stages (P90), which again suggested a possible autophagy blockage in transgenic females. Actually, the p62 upregulation at the terminal stage (P120) reinforced the hypothesis that the accumulation of p62, which was not parallel to a significant upregulation of LC3-II levels at this stage, might indicate a defective autophagy. Although no statistically significance was found in LC3-II levels at the terminal stage, we further studied in depth in transgenic females at this stage, whether the upregulation of p62 and the upward trend found in LC3-II levels were actually due to an autophagy blockage. To this

purpose, we blocked the activity of acidic degradative compartments using chloroquine in transgenic SOD1G93A female mice at the terminal stage, P120. In case an autophagy activation was still present a significant upregulation of LC3-II levels would be found since chloroquine blocks the fusion of autophagosomes and lysosomes and therefore it inhibits the lysosomal protein degradation. On the contrary, in case an autophagy blockage was happening in the spinal cord tissue from transgenic females no significant changes of LC3-II levels would be found since chloroquine would not have any effect on the autophagy process if it was blockaded. After treating with chloroquine the explants from spinal cord, no significant differences were found in LC3-II levels with respect to wild type mice. Therefore, this result revealed that the upregulation found in p62 levels at this late stage of the disease in transgenic females was due to an autophagy blockage. As a consequence, the autophagy process, in terms of LC3-II and p62 protein levels, was blockaded in the spinal cord from both transgenic males and females along disease progression. This autophagy blockage was more evident in transgenic males, especially at the terminal stage when both LC3-II and p62 levels were found significantly downregulated, while in transgenic females the parallel upregulation of LC3-II and p62 levels at this stage P120 also suggested a blockage and not an activation as it might be expected. These data are consistent with previous studies in the same tissue, in which the efficiency of autophagy activation was lower in motor neurons than in skeletal muscle.^{8,33} In addition, the LC3-II upregulation observed by Li and coworkers in the spinal cord from transgenic SOD1G93A mice at symptomatic stage did not correlated with the accumulation of autophagic vacuoles found at the terminal stage and confirmed by electron microscopy imaging.¹⁶ Indeed, we also observed a LC3-II upregulation at the symptomatic stage in both transgenic males and females, and similarly a potential defective autophagy at the terminal stage by means of a LC3-II downregulation in transgenic males and a p62 upregulation in transgenic females.

The next question that arouse to us was the role of the proteasome activity in the spinal cord of transgenic SOD1G93A male and female mice to compensate the defective autophagy along disease progression. At this step, we wonder if the proteasome activation could be time-dependent in the spinal cord, especially in transgenic females since the p62 upregulation was significant at the terminal

stage. Previous studies in this animal model showed an impairment of the UPS caused by mutant SOD1 in motor neurons. In fact, the intracellular accumulation of mutant SOD1 proteins in spinal cord correlated with a decrease in constitutive proteasome subunits during disease progression.^{2, 34-36} In accordance with these studies, our results showed an impairment in proteasome activity along disease progression. In transgenic SOD1G93A males, a significant downregulation of proteasome activity was found at symptomatic stage, P90, while a significant upregulation was registered at asymptomatic (P40) and terminal (P120) stages. Similarly, in transgenic SOD1G93A females, a significant upregulation of proteasome activity was registered at the terminal stage (P120) although a downregulated activity was found at asymptomatic (P40) and symptomatic (P90) stages. These results suggested that the proteasome degradation in transgenic males started to be activated at very early stages of the disease, even earlier than in transgenic females. However, this activation was not constant along disease progression, showing an upregulation at the terminal stage in both transgenic males and females. Interestingly, the proteasome activation at asymptomatic stage (P40) in transgenic males could reveal an early degradation of short proteins, which was blocked in transgenic females. This early activation of the proteasome in transgenic males was coincident with the upregulation in LC3-II levels at this asymptomatic stage, suggesting that the removal of mutant SOD1 proteins could not be efficient enough to avoid the accumulation of autophagosomes that might explain the LC3-II upregulated levels and the defective autophagy. In addition, the proteasome impairment in transgenic females at the asymptomatic stage was not sufficient enough to prompt the autophagy activation since LC3-II levels were not significantly higher than the ones found in wild type mice, in accordance with previous studies.³³

Collectively, these data clarified that the proteasome degradation was highly favoured in the spinal cord from transgenic SOD1G93A male and female mice, especially at the terminal stage, while a defective autophagy was observed at mRNA and protein levels, suggesting that the LC3-II upregulated levels found at the first stages of the disease could point out to an accumulation of autophagosomes and not to an autophagy activation. As a consequence, a defective autophagy in transgenic males and females could prompt the proteasome activation at late stages of the disease, reinforcing the

compensatory effect between the two degradative systems. These findings accurately analyze, for the first time, the role of autophagy and the proteasome in males and females separately to avoid sex bias and they provide new insights into the role of autophagy and the proteasome in the progression of ALS in one of the most vulnerable tissue, the spinal cord. It remains to be clarify the impairment between these two degradative systems in the spinal cord from transgenic SOD1G93A mice to address a possible progress in the design of promising therapeutic interventions.

Materials and Methods

Animals

The care and use of animals were performed accordingly with the Spanish Policy for Animal Protection RD53/2013, which meets the European Union Directive 2010/63/UE on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes.

Transgenic mice with the G93A mutant human SOD1 were purchased from The Jackson Laboratory (B6SJLTg(SOD1*G93A)1Gur/J). Hemizygotic mice were maintained by breeding SOD1G93 males with F1 females (B6SJL). The offspring were genotyped by PCR amplification of DNA extracted from tail tissue with specific primers for human SOD1. Wild type littermates were used as controls for all experiments. Hemizygous SOD1G93A mice at the following days of life were used: 40 (presymptomatic, P40), 60 (early symptomatic, P60), 90 (symptomatic, P90) and 120 (terminal stage, P120). Mice were housed in the Unidad Mixta de Investigación of the University of Zaragoza under a 12h light/dark cycle. Food and water were available *ad libitum*. Hemizygous SOD1G93A and age-matched non-transgenic wild type mice were sacrificed by CO₂ anesthesia.

Quantification of mRNA expression

For total RNA extraction, five males and five females wild type and SOD1G93A mice per age group were sacrificed. The spinal cord were dissected, snap-frozen and stored at -80°C. Spinal cord from each group of mice were pulverized in liquid nitrogen with a cell crusher. The powdered spinal cords were homogenized using a PRO200 homogenizer (PRO Scientific Inc.) and processing according to

the Trizol Reagent protocol (Invitrogen). RNA extracted was processed with the Turbo DNA-free™ kit (Ambion) to eliminate genomic DNA. Reverse transcription was carried out according to the SuperScript™ First-Strand Synthesis System kit (Invitrogen) using random hexamers. Gene expression variations in all of the samples were assayed by real-time PCR in an ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Primer and probe mixtures for each gene LC3 (Mm00458724_m1), p62 (Mm00448091_m1), Beclin1 (Mm00517174_m1), ATG5 (Mm00504340_m1) and E2F1 (Mm00432939_m1) were supplied by Applied Biosystems. Target gene expression was normalized using the geometric mean of two housekeeping genes (GAPDH, Mm4352932E and β -actin, Mm4352933E; Applied Biosystems) and relative gene expression was determined using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method.^{37,38} All reactions were performed in triplicate and the reaction efficiencies of the primer/probe sets were close to 100%.

Western blot analysis

Six males and six females wild type and SOD1G93A mice at P40, P60, P90 and P120 were sacrificed. The spinal cord were dissected, snap-frozen and stored at -80°C. Spinal cord were pulverized in liquid nitrogen with a cell crusher. Powdered spinal cord tissues were resuspended in ice-cold RIPA lysis buffer with protease inhibitors (Complete, Roche) and samples were centrifuged at 10000 g for 10 min at 4°C. Supernatants were collected and the total protein was quantified by BCA method (Sigma-Aldrich). Proteins (40 μ g) were resolved on a 15% SDS-page gel and the transferred to PVDF membranes (Amersham Biosciences). Membranes were blocked in Tris-buffered saline supplemented with 0.1% Tween 20 and 5% (w/v) powdered skim milk overnight at 4°C and then incubated with primary antibodies for one hour at room temperature against LC3 (1:1000, MBL), p62/SQSTM1 (1:1000, Enzo Life Sciences), and GAPDH (1:1000, Santa Cruz). Membranes were incubated for 1 hour at room temperature in a solution containing the HRP-conjugated secondary antibodies. Bands were visualized by enhanced chemiluminescent reagent (GE Healthcare Life Science). Immunoblots were scanned and densitometry was measured with AlphaEase FC software (Bonsai).

Proteasome activity

Three males and three females wild type and SOD1G93A mice per age group were sacrificed and spinal cords were dissected. Samples were homogenized in cold buffer (20 mM TrisHCl pH 7.5, 2 mM EDTA) and centrifuged at 15000 g for 10 min at 4°C (3 males and 3 females per time point and genotype). Protein concentration in supernatants was determined using the BCA protein assay. Ten micrograms of freshly protein extracts were assayed in triplicate. Proteasome activity was measured using the CHEMICON® Proteasome Activity Assay Kit (APT280, Millipore) as described by the manufacturer. The extracts were incubated (2h at 37°C) with a labeled substrate, LLVY-7-amino-4-methylcoumarin, and the cleavage activity was monitored by detection of the free fluorophore 7-amino-4-methylcoumarin using a fluorescence plate reader (Infinite F200 PRO, TECAN) at 360/460 nm.

Chloroquine assay

Four males and four females SOD1G93A mice at P90 and P120 were sacrificed and spinal cords were dissected and the tissues were chopped into small pieces. The explants were rinsed in phosphate-buffered saline (PBS) prior to being cultured in DMEM containing 10 % (v/v) fetal bovine serum and 100 μ M chloroquine (Sigma) for 6 hours at 37°C and 5% CO₂. After chloroquine treatment, the tissues were washed twice with PBS, snap-frozen and preserved at -80°C. To determine the effect of chloroquine, proteins were extracted and Western Blot analyzed the LC3-II expression (as described above).

Statistics

Statistical analyses were performed using SPSS 19.0 (IBM). Comparisons were carried out by T-Student test. Statistical differences were considered significant at $p < 0.05$.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Miriam de la Torre, Silvia Garcés and Pilar Lierta for their expert technical assistance. They also thank Dr. Patricia Boya and Dr. Victor Sorribas for their helpful assistance. This work was supported by Grants PI10/0178 from Fondo de Investigación Sanitaria of Spain and INNPACTO IPT-2011-1091-900000 Ministerio de Ciencia e Innovación.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

RO supervised all experiments. SO and ACC wrote the manuscript. SO and MH performed the experiments. PZ provided helpful discussions and helped in the revision of the manuscript.

REFERENCES

1. Lomen-Hoertz C. Amyotrophic Lateral Sclerosis from Bench to Bedside. *Seminars in Neurol.* 2008; 28: 205-211.
2. Bendotti C, Marino M, Cheroni C, Fontana E, Crippa V, Poletti A, et al. Dysfunction of constitutive and inducible ubiquitin-proteasome system in amyotrophic lateral sclerosis: implication for protein aggregation and immune response. *Prog. Neurobiol.* 2012; 97: 101-126.
3. Mizushima N, Kuma A. Autophagosomes in GFP-LC3 transgenic mice. *Methods Mol. Biol.* 2008; 445: 119-124.
4. Kabuta T, Suzuki Y, Wada K. Degradation of Amyotrophic Lateral Sclerosis-linked Mutant Cu,Zn-Superoxide Dismutase Proteins by Macroautophagy and the Proteasome. *J. Biol. Chem.* 2006; 281: 30524-30533.
5. Winslow AR, Rubinsztein DC. Autophagy in neurodegeneration and development. *Biochim. Biophys. Acta* 2008; 1782: 723-729.
6. Hetz C, Thielen P, Matus S, Nassif M, Court F, Kiffin R, et al. XBP-1 deficiency in the nervous system protects against amyotrophic lateral sclerosis by increasing autophagy. *Genes Dev.* 2009; 23: 2294-2306.
7. Madeo F, Eisenberg T, Kroemer G. Autophagy for the avoidance of neurodegeneration. *Genes Dev.* 2009; 23: 2253-2259.
8. Onesto E, Rusmini P, Crippa V, Ferri N, Zito A, Galbiati M, et al. Muscle cells and motoneurons differentially remove mutant SOD1 causing familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* 2011; 118: 266-280.
9. Mori A, Yamashita S, Uchino K, Suga T, Ikeda T, Takamatsu K, et al. Derlin-1 overexpression ameliorates mutant SOD1-induced endoplasmic reticulum stress by reducing mutant SOD1 accumulation. *Neurochem. Internat.* 2011; 58: 344-353.
10. Ferrucci M, Fulceri F, Toti L, Soldani P, Siciliano G, Paparelli A, et al. Protein clearing pathways in ALS. *Arch. Ital. Biol.* 2011; 149: 121-149.
11. Otomo A, Pan L, Hadano S. Dysregulation of the Autophagy-Endolysosomal System in Amyotrophic Lateral Sclerosis and Related Motor Neuron Diseases. *Neurol. Res. Int.* 2012; 2012: 498428, doi:10.1155/2012/498428.
12. Dasuri K, Zhang L, Keller JN. Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis. *Free Rad. Biol. Med.* 2013; 62: 170-185.
13. Sau D, De Biasi S, Vitellaro-Zuccarello L, Riso P, Guarnieri S, Porrini M, et al. Mutation of SOD1 Mutation of SOD1 in ALS: a gain of a loss of function. *Human Mol. Genet.* 2007; 16: 1604-1618.
14. Nedelsky NB, Todd PK, Taylor JP. Autophagy and the ubiquitin-proteasome system: collaborators in neuroprotection. *Biochim. Biophys. Acta* 2008; 1782: 691-699.
15. Venkatachalam K, Long AA, Elsaesser R, Nikolaeva D, Broadie K, Montell C. Motor deficit in a Drosophila model of mucopolidosis type IV due to defective clearance of apoptotic cells. *Cell* 2008; 135: 838-851.
16. Li L, Zhang X, Le W. Altered macroautophagy in the spinal cord of SOD1 mutant mice. *Autophagy* 2008; 4: 290-293.
17. Fornai F, Longone P, Cafaro L, Kastsiuchenka O, Ferrucci M, Manca ML, et al. Lithium delays progression of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008; 105: 2052-2057.

18. Fornai F, Longone P, Ferrucci M, Lenzi P, Isidoro C, Ruggieri S, et al. Autophagy and amyotrophic lateral sclerosis: The multiple roles of lithium. *Autophagy* 2008; 4: 527-530.
19. Fornai F, Siciliano G, Manca ML, Murri L, Paparelli A, Ruggieri S. Lithium in ALS: from the bench to the bedside. *Amyotroph Lateral Scler* 2008; 9(2): 123-124.
20. Calderó J, Brunet N, Tarabal O, Piedrafita L, Hereu M, Ayala V, et al. Lithium prevents excitotoxic cell death of motoneurons in organotypic slice cultures of spinal cord. *Neuroscience* 2010; 165: 1353-1369.
21. Basso M, Massignan T, Samengo G, Cheroni C, De Biasi S, Salmona M, et al. Insoluble mutant SOD1 is partly oligoubiquitinated in amyotrophic lateral sclerosis mice. *J. Biol. Chem.* 2006; 281: 33325-33335.
22. Zhang X, Li L, Chen S, Yang D, Wang Y, Zhang X, et al. Rapamycin treatment augments motor neuron degeneration in SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Autophagy* 2011; 7: 412-425.
23. Zhang X, Chen S, Song L, Tang Y, Shen Y, Jia L, et al. MTOR-independent, autophagic enhancer trehalose prolongs motor neuron survival and ameliorates the autophagic flux defect in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Autophagy* 2014; 10: 588-602.
24. Kim J, Kim TY, Cho KS, Kim HN, Koh JH. Autophagy activation and neuroprotection by progesterone in the G93A-SOD1 transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Dis.* 2013; 59: 80-85.
25. Oliván S, Calvo AC, Manzano R, Zaragoza P, Osta R. Sex Differences in Constitutive Autophagy. *BioMed Res. Int.* 2014; 2014: 652817. doi: 10.1155/2014/652817.
26. Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell* 2010; 140: 313-326.
27. Pasinelli P, Brown RH. Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: Insights from genetics. *Nat. Rev. Neurosci.* 2006; 7: 710-723.
28. Zheng Q, Li J, Wang X. Interplay between the ubiquitin-proteasome system and autophagy in proteinopathies. *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* 2009; 1: 127-142.
29. Crippa V, Carra S, Rusmini P, Sau D, Bolzoni E, Bendotti C, et al. A role of small heat shock protein B8 (HspB8) in the autophagic removal of misfolded proteins responsible for neurodegenerative diseases. *Autophagy* 2010; 6: 958-960.
30. Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, et al. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 2006; 441: 885-889.
31. Korolchuk VI, Menzies FM, Rubinsztein DC. Mechanisms of cross-talk between the ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome systems. *FEBS Lett.* 2010; 584: 1393-1398.
32. Morimoto N, Nagai M, Ohta Y, Miyazaki K, Kurata T, Morimoto M, et al. Increased autophagy in transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. *Brain Res.* 2007; 1167: 112-117.
33. Crippa V, Boncoraglio A, Galbiati M, Aggarwal T, Rusmini P, Giorgetti E, et al. Differential autophagy power in the spinal cord and muscle of transgenic ALS mice. *Frontiers in Cell Neurosci.* 2013; 7: 1-12, doi: 10.3389/fncel.2013.00234.
34. Cheroni C, Peviani M, Cascio P, Debiasi S, Monti C, Bendotti C. Accumulation of human SOD1 and ubiquitinated deposits in the spinal cord of SOD1G93A mice during motor neuron disease progression correlates with a decrease of proteasome. *Neurobiol. Dis.* 2005; 18: 509-522.

35. Kabashi E, Agar JN, Hong Y, Taylor DM, Minotti S, Figlewicz DA, et al. Proteasomes remain intact, but show early focal alteration in their composition in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* 2008; 105: 2353-2366.
36. Urushitani M, Kurisu J, Tsukita K, Takahashi R, 2002. Proteasomal inhibition by misfolded mutant superoxide dismutase 1 induces selective motor neuron death in familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* 2002; 83: 1030–1042.
37. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002; 3: RESEARCH0034.
38. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing **real-time PCR** data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc.* 2008; 3:1101-8.

FIGURE LEGENDS

Figure 1 *LC3*, *p62*, *Beclin1*, *Atg5* and *E2f1* mRNA expression levels in spinal cord from SOD1G93A mice (males (a), females (b)). The transcript levels of these autophagy markers were analyzed at P60, P90, and P120. Relative expression values of these autophagy markers in SOD1G93A mice were represented in relation to the levels of their age-matched wild type mice (WT, black bars) at each studied stage. Each data point represented the mean \pm SEM, balanced group n=10 males and 10 females per time-point and genotype. Asterisks denoted a student t-test p value <0.05 (*).

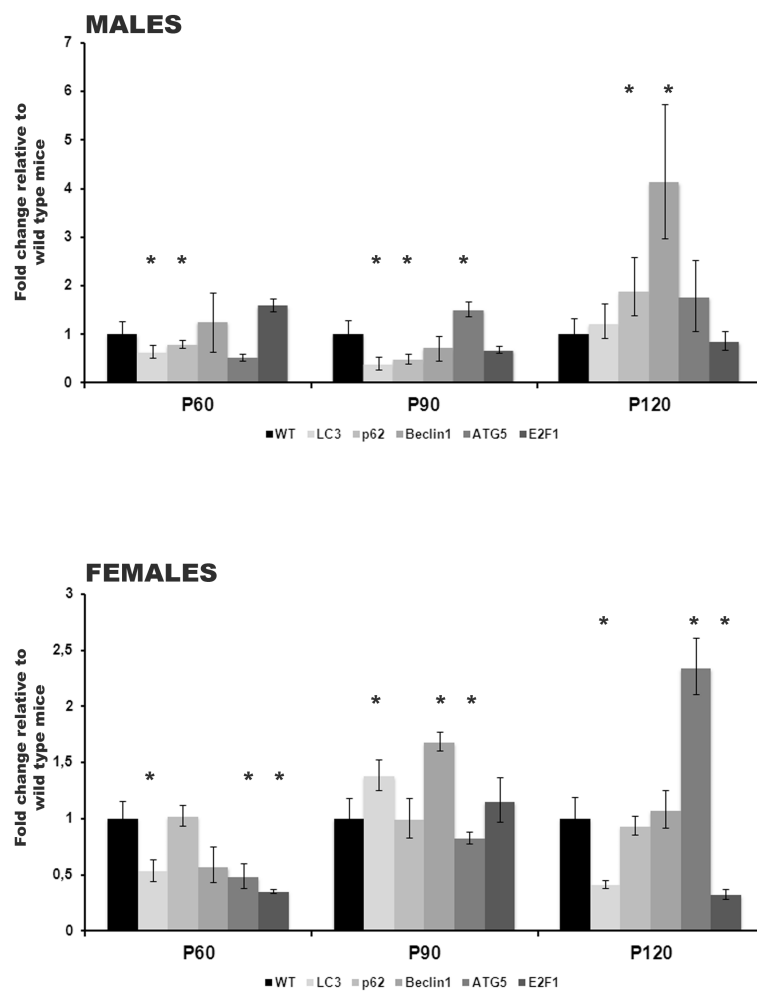


Figure 2 LC3-II and p62 protein expression levels in spinal cord. (a) Western blots for LC3-II and p62 protein levels in spinal cord from transgenic SOD1G93A mice (males and females) and age-matched wild type mice (WT, black bars). GAPDH protein levels were used for the normalization of the protein levels of the selected autophagy markers. The representative blots for each stage of the disease are shown at the bottom of each corresponding graph. Data showed mean \pm SEM, balanced group $n=12$ animals, males and females, per time-point and genotype. p value <0.05 (*) and <0.01 (**). (b) Relative expression levels of LC3-II in spinal cord from SOD1G93A female mice at the terminal stage, after chloroquine treatment (CQ 100 μ M). The representative blots for each stage of the disease are shown at the bottom; GAPDH protein levels were used for the normalization of the data. Data showed mean \pm SEM, balanced group $n=4$ transgenic SOD1G93A male mice and $n=4$ transgenic SOD1G93A female mice at symptomatic and terminal stages, respectively.

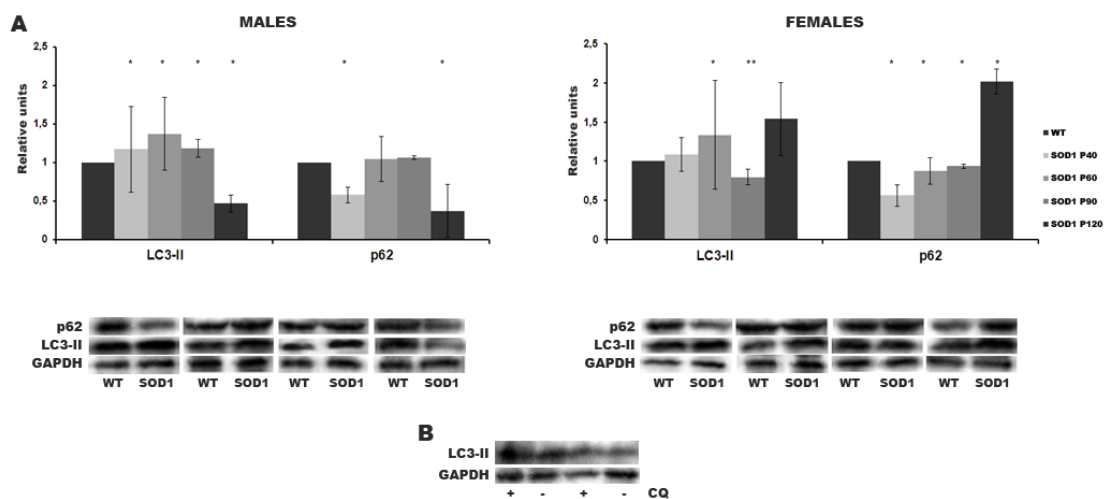
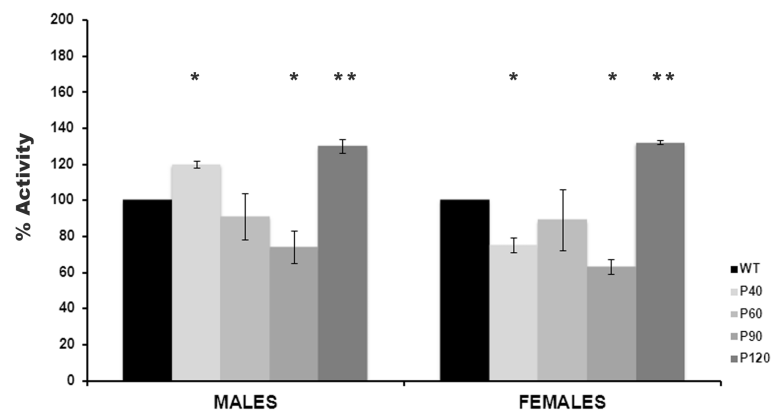


Figure 3 Proteasome activity measurements. Proteasome activity was measured in spinal cord homogenates from SOD1G93A male and female mice and from age-matched wild type mice (WT, black bars) at each stage of the disease, P40, P60, P90 and P120. Data showed mean \pm SEM, balanced group n=6 animals per time-point and genotype. p value <0.05 (*) and <0.01 (**).



CONCLUSIONES



De los resultados obtenidos a partir de las experiencias realizadas en el presente estudio, de su discusión y contraste con otras aportaciones, pueden deducirse las siguientes conclusiones:

1. Los procesos de degradación proteica, autofagia y proteasoma, muestran un efecto compensatorio en el músculo esquelético de los animales modelo SOD1G93A. En los estadios presintomáticos se induce la activación del proteasoma, mientras que la activación de la autofagia se produce en los estadios terminales de la enfermedad. No se observa en dicho tejido el fenómeno de muerte celular programada.
2. Una dieta enriquecida en grasas insaturadas, y más concretamente en aceite de oliva virgen extra, es capaz de incrementar la supervivencia y la coordinación motora de los animales modelos SOD1G93A. En el músculo esquelético, este efecto se acompaña de una mejora de los indicadores moleculares relacionados con el estrés de retículo, la autofagia y el daño tisular. Teniendo en cuenta estos resultados se recomienda a los pacientes de ELA la inclusión de este tipo de aceite en su dieta.
3. Los procesos de degradación proteica en médula espinal de los animales modelo SOD1G93A están alterados a lo largo de la enfermedad. En este tejido el efecto compensatorio entre ambos procesos observado en músculo esquelético no se produce. La autofagia no presenta un papel tan relevante a lo largo de la enfermedad y el proteasoma se encuentra activado sólo en los estadios terminales de la enfermedad.
4. Las alteraciones en los procesos de degradación proteica a lo largo de la enfermedad se presentan como una posible diana terapéutica, tal como ha sido demostrado con la administración de una dieta enriquecida con aceite de oliva extra virgen.

The results obtained from experiments carried out in this study, its discussion and contrast with other contributions, prompted us to the following conclusions:

1. The processes of protein degradation, autophagy and proteasome, show a compensatory effect in skeletal muscle of the SOD1G93A mice model. In presymptomatic stages, proteasome activation is induced, while autophagy activation occurs in the terminal stages of the disease. The phenomenon of programmed cell death is not observed in the tissue.
2. An unsaturated fats-enriched diet, particularly in extra virgin olive oil, is able to increase the survival and the motor coordination of the SOD1G93A mice model. In skeletal muscle, this effect is accompanied by an improvement of the molecular indicators related to ER stress, autophagy and tissue damage. Taking into account these results, the inclusion of extra virgin olive oil in the ALS patient's diet should be recommended.
3. The processes of protein degradation are impaired along disease in spinal cord of SOD1G93A mice model. In this tissue, the compensatory effect observed in skeletal muscle between the two processes does not occur. Autophagy no such an important role throughout the illness and the proteasome is activated only in the terminal stages of the disease.
4. The impairment of the protein degradation processes along disease represents a potential therapeutic target, as has been demonstrated with the administration of an extra virgin olive oil-enriched diet.

BIBLIOGRAFÍA



- Ackerley S, Grierson AJ, Brownlees J, Thornhill P, Anderton BH, Leigh PN, Shaw CE, Miller CC. 2000. Glutamate slows axonal transport of neurofilaments in transfected neurons. *The Journal of cell biology* **150**(1): 165-176.
- Al-Chalabi A, Hardiman O. 2013. The epidemiology of ALS: a conspiracy of genes, environment and time. *Nature reviews Neurology* **9**(11): 617-628.
- Altman BJ, Rathmell JC. 2012. Metabolic stress in autophagy and cell death pathways. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **4**(9): a008763.
- Amerik AY, Hochstrasser M. 2004. Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochimica et biophysica acta* **1695**(1-3): 189-207.
- An T, Shi P, Duan W, Zhang S, Yuan P, Li Z, Wu D, Xu Z, Li C, Guo Y. 2014. Oxidative Stress and Autophagic Alteration in Brainstem of SOD1-G93A Mouse Model of ALS. *Molecular neurobiology*.
- Andersen PM. 2006. Amyotrophic lateral sclerosis associated with mutations in the CuZn superoxide dismutase gene. *Current neurology and neuroscience reports* **6**(1): 37-46.
- Andersen PM, Al-Chalabi A. 2011. Clinical genetics of amyotrophic lateral sclerosis: what do we really know? *Nature reviews Neurology* **7**(11): 603-615.
- Arnold ES, Ling SC, Huelga SC, Lagier-Tourenne C, Polymenidou M, Ditsworth D, Kordasiewicz HB, McAlonis-Downes M, Platoshyn O, Parone PA et al. 2013. ALS-linked TDP-43 mutations produce aberrant RNA splicing and adult-onset motor neuron disease without aggregation or loss of nuclear TDP-43. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**(8): E736-745.
- Arundine M, Tymianski M. 2003. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell calcium* **34**(4-5): 325-337.
- Azzouz M, Ralph GS, Storkebaum E, Walmsley LE, Mitrophanous KA, Kingsman SM, Carmeliet P, Mazarakis ND. 2004. VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS model. *Nature* **429**(6990): 413-417.
- Baehrecke EH. 2005. Autophagy: dual roles in life and death? *Nature reviews Molecular cell biology* **6**(6): 505-510.
- Barber SC, Shaw PJ. 2010. Oxidative stress in ALS: key role in motor neuron injury and therapeutic target. *Free radical biology & medicine* **48**(5): 629-641.
- Basso M, Massignan T, Samengo G, Cheroni C, De Biasi S, Salmona M, Bendotti C, Bonetto V. 2006. Insoluble mutant SOD1 is partly oligoubiquitinated in amyotrophic lateral sclerosis mice. *The Journal of biological chemistry* **281**(44): 33325-33335.
- Bendotti C, Carri MT. 2004. Lessons from models of SOD1-linked familial ALS. *Trends in molecular medicine* **10**(8): 393-400.
- Bendotti C, Marino M, Cheroni C, Fontana E, Crippa V, Poletti A, De Biasi S. 2012. Dysfunction of constitutive and inducible ubiquitin-proteasome system in amyotrophic lateral sclerosis: implication for protein aggregation and immune response. *Progress in neurobiology* **97**(2): 101-126.
- Bilsland LG, Sahai E, Kelly G, Golding M, Greensmith L, Schiavo G. 2010. Deficits in axonal transport precede ALS symptoms in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**(47): 20523-20528.

- Blasco H, Corcia P, Moreau C, Veau S, Fournier C, Vourc'h P, Emond P, Gordon P, Pradat PF, Praline J et al. 2010. 1H-NMR-based metabolomic profiling of CSF in early amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS one* **5**(10): e13223.
- Boston-Howes W, Gibb SL, Williams EO, Pasinelli P, Brown RH, Jr., Trotti D. 2006. Caspase-3 cleaves and inactivates the glutamate transporter EAAT2. *The Journal of biological chemistry* **281**(20): 14076-14084.
- Boya P, Reggiori F, Codogno P. 2013. Emerging regulation and functions of autophagy. *Nature cell biology* **15**(7): 713-720.
- Braun MM, Osecheck M, Joyce NC. 2012. Nutrition assessment and management in amyotrophic lateral sclerosis. *Physical medicine and rehabilitation clinics of North America* **23**(4): 751-771.
- Cahova M, Dankova H, Palenickova E, Papackova Z, Kazdova L. 2010. The autophagy-lysosomal pathway is involved in TAG degradation in the liver: the effect of high-sucrose and high-fat diet. *Folia biologica* **56**(4): 173-182.
- Caldero J, Brunet N, Tarabal O, Piedrafita L, Hereu M, Ayala V, Esquerda JE. 2010. Lithium prevents excitotoxic cell death of motoneurons in organotypic slice cultures of spinal cord. *Neuroscience* **165**(4): 1353-1369.
- Calvo AC, Moreno-Igoa M, Manzano R, Ordovas L, Yague G, Oliván S, Muñoz MJ, Zaragoza P, Osta R. 2008. Determination of protein and RNA expression levels of common housekeeping genes in a mouse model of neurodegeneration. *Proteomics* **8**(20): 4338-4343.
- Clague MJ, Urbe S. 2010. Ubiquitin: same molecule, different degradation pathways. *Cell* **143**(5): 682-685.
- Codogno P, Meijer AJ. 2006. Atg5: more than an autophagy factor. *Nature cell biology* **8**(10): 1045-1047.
- Corazzari M, Fimia GM, Piacentini M. 2012. Dismantling the autophagic arsenal when it is time to die: concerted AMBRA1 degradation by caspases and calpains. *Autophagy* **8**(8): 1255-1257.
- Crippa V, Boncoraglio A, Galbiati M, Aggarwal T, Rusmini P, Giorgetti E, Cristofani R, Carra S, Pennuto M, Poletti A. 2013. Differential autophagy power in the spinal cord and muscle of transgenic ALS mice. *Frontiers in cellular neuroscience* **7**: 234.
- Crippa V, Carra S, Rusmini P, Sau D, Bolzoni E, Bendotti C, De Biasi S, Poletti A. 2010. A role of small heat shock protein B8 (HspB8) in the autophagic removal of misfolded proteins responsible for neurodegenerative diseases. *Autophagy* **6**(7): 958-960.
- Crugnola V, Lamperti C, Lucchini V, Ronchi D, Peverelli L, Prella A, Sciacco M, Bordoni A, Fassone E, Fortunato F et al. 2010. Mitochondrial respiratory chain dysfunction in muscle from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Archives of neurology* **67**(7): 849-854.
- Cuervo AM. 2011. Chaperone-mediated autophagy: Dice's 'wild' idea about lysosomal selectivity. *Nature reviews Molecular cell biology* **12**(8): 535-541.
- Cutler RG, Pedersen WA, Camandola S, Rothstein JD, Mattson MP. 2002. Evidence that accumulation of ceramides and cholesterol esters mediates oxidative stress-induced death of motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of neurology* **52**(4): 448-457.
- Chang Y, Kong Q, Shan X, Tian G, Ilieva H, Cleveland DW, Rothstein JD, Borchelt DR, Wong PC, Lin CL. 2008. Messenger RNA oxidation occurs early in disease pathogenesis and promotes motor neuron degeneration in ALS. *PLoS one* **3**(8): e2849.

- Chen S, Zhang X, Song L, Le W. 2012. Autophagy dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Pathol* **22**(1): 110-116.
- Chen Y, Klionsky DJ. 2011. The regulation of autophagy - unanswered questions. *Journal of cell science* **124**(Pt 2): 161-170.
- Chen YZ, Bennett CL, Huynh HM, Blair IP, Puls I, Irobi J, Dierick I, Abel A, Kennerson ML, Rabin BA et al. 2004. DNA/RNA helicase gene mutations in a form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis (ALS4). *American journal of human genetics* **74**(6): 1128-1135.
- Cheroni C, Marino M, Tortarolo M, Veglianesi P, De Biasi S, Fontana E, Zuccarello LV, Maynard CJ, Dantuma NP, Bendotti C. 2009. Functional alterations of the ubiquitin-proteasome system in motor neurons of a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Human molecular genetics* **18**(1): 82-96.
- Cheroni C, Peviani M, Cascio P, De Biasi S, Monti C, Bendotti C. 2005. Accumulation of human SOD1 and ubiquitinated deposits in the spinal cord of SOD1G93A mice during motor neuron disease progression correlates with a decrease of proteasome. *Neurobiology of disease* **18**(3): 509-522.
- Chio A, Calvo A, Ilardi A, Cavallo E, Moglia C, Mutani R, Palmo A, Galletti R, Marinou K, Papetti L et al. 2009. Lower serum lipid levels are related to respiratory impairment in patients with ALS. *Neurology* **73**(20): 1681-1685.
- De Vos KJ, Chapman AL, Tennant ME, Manser C, Tudor EL, Lau KF, Brownlees J, Ackerley S, Shaw PJ, McLoughlin DM et al. 2007. Familial amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutants perturb fast axonal transport to reduce axonal mitochondria content. *Human molecular genetics* **16**(22): 2720-2728.
- DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Rutherford NJ, Nicholson AM, Finch NA, Flynn H, Adamson J et al. 2011. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* **72**(2): 245-256.
- Dewey CM, Cenik B, Sephton CF, Johnson BA, Herz J, Yu G. 2012. TDP-43 aggregation in neurodegeneration: are stress granules the key? *Brain research* **1462**: 16-25.
- Ding WX, Ni HM, Gao W, Yoshimori T, Stolz DB, Ron D, Yin XM. 2007. Linking of autophagy to ubiquitin-proteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability. *The American journal of pathology* **171**(2): 513-524.
- Ding WX, Yin XM. 2008. Sorting, recognition and activation of the misfolded protein degradation pathways through macroautophagy and the proteasome. *Autophagy* **4**(2): 141-150.
- Dobrowolny G, Aucello M, Molinaro M, Musaro A. 2008. Local expression of mlgf-1 modulates ubiquitin, caspase and CDK5 expression in skeletal muscle of an ALS mouse model. *Neurological research* **30**(2): 131-136.
- Dobrowolny G, Aucello M, Musaro A. 2011. Muscle atrophy induced by SOD1G93A expression does not involve the activation of caspase in the absence of denervation. *Skeletal muscle* **1**(1): 3.
- Dorst J, Kuhnlein P, Hendrich C, Kassubek J, Sperfeld AD, Ludolph AC. 2011. Patients with elevated triglyceride and cholesterol serum levels have a prolonged survival in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neurology* **258**(4): 613-617.

- Duan W, Li X, Shi J, Guo Y, Li Z, Li C. 2010. Mutant TAR DNA-binding protein-43 induces oxidative injury in motor neuron-like cell. *Neuroscience* **169**(4): 1621-1629.
- Dupuis L, Corcia P, Fergani A, Gonzalez De Aguilar JL, Bonnefont-Rousselot D, Bittar R, Seilhean D, Hauw JJ, Lacomblez L, Loeffler JP et al. 2008. Dyslipidemia is a protective factor in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* **70**(13): 1004-1009.
- Dupuis L, Oudart H, Rene F, Gonzalez de Aguilar JL, Loeffler JP. 2004. Evidence for defective energy homeostasis in amyotrophic lateral sclerosis: benefit of a high-energy diet in a transgenic mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(30): 11159-11164.
- Dupuis L, Pradat PF, Ludolph AC, Loeffler JP. 2011. Energy metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet neurology* **10**(1): 75-82.
- Estruch R, Ros E, Salas-Salvado J, Covas MI, Corella D, Aros F, Gomez-Gracia E, Ruiz-Gutierrez V, Fiol M, Lapetra J et al. 2013. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *N Engl J Med* **368**(14): 1279-1290.
- Fergani A, Oudart H, Gonzalez De Aguilar JL, Fricker B, Rene F, Hocquette JF, Meininger V, Dupuis L, Loeffler JP. 2007. Increased peripheral lipid clearance in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of lipid research* **48**(7): 1571-1580.
- Ferraiuolo L, Kirby J, Grierson AJ, Sendtner M, Shaw PJ. 2011. Molecular pathways of motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature reviews Neurology* **7**(11): 616-630.
- Finley D. 2009. Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annual review of biochemistry* **78**: 477-513.
- Fischer LR, Culver DG, Tennant P, Davis AA, Wang M, Castellano-Sanchez A, Khan J, Polak MA, Glass JD. 2004. Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Experimental neurology* **185**(2): 232-240.
- Fischer LR, Glass JD. 2007. Axonal degeneration in motor neuron disease. *Neurodegenerative diseases* **4**(6): 431-442.
- Fitzmaurice PS, Shaw IC, Kleiner HE, Miller RT, Monks TJ, Lau SS, Mitchell JD, Lynch PG. 1996. Evidence for DNA damage in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle & nerve* **19**(6): 797-798.
- Fornai F, Longone P, Cafaro L, Kastsuchenka O, Ferrucci M, Manca ML, Lazzeri G, Spalloni A, Bellio N, Lenzi P et al. 2008a. Lithium delays progression of amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**(6): 2052-2057.
- Fornai F, Longone P, Ferrucci M, Lenzi P, Isidoro C, Ruggieri S, Paparelli A. 2008b. Autophagy and amyotrophic lateral sclerosis: The multiple roles of lithium. *Autophagy* **4**(4): 527-530.
- Fujita N, Itoh T, Omori H, Fukuda M, Noda T, Yoshimori T. 2008. The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Molecular biology of the cell* **19**(5): 2092-2100.
- Funalo B, Desport JC, Sturtz F, Camu W, Couratier P. 2009. High metabolic level in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic lateral sclerosis : official publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases* **10**(2): 113-117.

- Gallo V, Wark PA, Jenab M, Pearce N, Brayne C, Vermeulen R, Andersen PM, Hallmans G, Kyrozi A, Vanacore N et al. 2013. Prediagnostic body fat and risk of death from amyotrophic lateral sclerosis: the EPIC cohort. *Neurology* **80**(9): 829-838.
- Galluzzi L, Aaronson SA, Abrams J, Alnemri ES, Andrews DW, Baehrecke EH, Bazan NG, Blagosklonny MV, Blomgren K, Borner C et al. 2009. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell death and differentiation* **16**(8): 1093-1107.
- Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. 2012a. Mitochondria: master regulators of danger signalling. *Nature reviews Molecular cell biology* **13**(12): 780-788.
- Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S et al. 2012b. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell death and differentiation* **19**(1): 107-120.
- Gao Z, Gammoh N, Wong PM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Jiang X. 2010. Processing of autophagic protein LC3 by the 20S proteasome. *Autophagy* **6**(1): 126-137.
- Geng J, Klionsky DJ. 2008. The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series. *EMBO reports* **9**(9): 859-864.
- Goldberg AL. 2003. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* **426**(6968): 895-899.
- Gonzalez de Aguilar JL, Niederhauser-Wiederkehr C, Halter B, De Tapia M, Di Scala F, Demougin P, Dupuis L, Primig M, Meininger V, Loeffler JP. 2008. Gene profiling of skeletal muscle in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Physiological genomics* **32**(2): 207-218.
- Gordon PH. 2013. Amyotrophic Lateral Sclerosis: An update for 2013 Clinical Features, Pathophysiology, Management and Therapeutic Trials. *Aging and disease* **4**(5): 295-310.
- Grosskreutz J, Van Den Bosch L, Keller BU. 2010. Calcium dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis. *Cell calcium* **47**(2): 165-174.
- Guillen N, Acin S, Navarro MA, Surra JC, Arnal C, Lou-Bonafonte JM, Muniesa P, Martinez-Gracia MV, Osada J. 2009. Knowledge of the biological actions of extra virgin olive oil gained from mice lacking apolipoprotein E. *Rev Esp Cardiol* **62**(3): 294-304.
- Guo H, Lai L, Butchbach ME, Stockinger MP, Shan X, Bishop GA, Lin CL. 2003. Increased expression of the glial glutamate transporter EAAT2 modulates excitotoxicity and delays the onset but not the outcome of ALS in mice. *Human molecular genetics* **12**(19): 2519-2532.
- Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, Caliando J, Hentati A, Kwon YW, Deng HX et al. 1994. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* **264**(5166): 1772-1775.
- Haidet-Phillips AM, Hester ME, Miranda CJ, Meyer K, Braun L, Frakes A, Song S, Likhite S, Murtha MJ, Foust KD et al. 2011. Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons. *Nature biotechnology* **29**(9): 824-828.
- Hamadeh MJ, Rodriguez MC, Kaczor JJ, Tarnopolsky MA. 2005. Caloric restriction transiently improves motor performance but hastens clinical onset of

- disease in the Cu/Zn-superoxide dismutase mutant G93A mouse. *Muscle & nerve* **31**(2): 214-220.
- Hanada T, Noda NN, Satomi Y, Ichimura Y, Fujioka Y, Takao T, Inagaki F, Ohsumi Y. 2007. The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *The Journal of biological chemistry* **282**(52): 37298-37302.
- Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H et al. 2006. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* **441**(7095): 885-889.
- Harras MM, Marden JJ, Zhou W, Zhang Y, Williams A, Sharov VS, Nelson K, Luo M, Paulson H, Schoneich C et al. 2008. SOD1 mutations disrupt redox-sensitive Rac regulation of NADPH oxidase in a familial ALS model. *The Journal of clinical investigation* **118**(2): 659-670.
- Hensley K, Abdel-Moaty H, Hunter J, Mhatre M, Mou S, Nguyen K, Potapova T, Pye QN, Qi M, Rice H et al. 2006. Primary glia expressing the G93A-SOD1 mutation present a neuroinflammatory phenotype and provide a cellular system for studies of glial inflammation. *Journal of neuroinflammation* **3**: 2.
- Hershko A, Ciechanover A. 1998. The ubiquitin system. *Annual review of biochemistry* **67**: 425-479.
- Hetz C, Thielen P, Matus S, Nassif M, Court F, Kiffin R, Martinez G, Cuervo AM, Brown RH, Glimcher LH. 2009. XBP-1 deficiency in the nervous system protects against amyotrophic lateral sclerosis by increasing autophagy. *Genes & development* **23**(19): 2294-2306.
- Higgins CM, Jung C, Xu Z. 2003. ALS-associated mutant SOD1G93A causes mitochondrial vacuolation by expansion of the intermembrane space and by involvement of SOD1 aggregation and peroxisomes. *BMC neuroscience* **4**: 16.
- Hirano A, Nakano I, Kurland LT, Mulder DW, Holley PW, Saccomanno G. 1984. Fine structural study of neurofibrillary changes in a family with amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neuropathology and experimental neurology* **43**(5): 471-480.
- Hochfeld WE, Lee S, Rubinsztein DC. 2013. Therapeutic induction of autophagy to modulate neurodegenerative disease progression. *Acta pharmacologica Sinica* **34**(5): 600-604.
- Hou W, Han J, Lu C, Goldstein LA, Rabinowich H. 2010. Autophagic degradation of active caspase-8: a crosstalk mechanism between autophagy and apoptosis. *Autophagy* **6**(7): 891-900.
- Inobe T, Matouschek A. 2014. Paradigms of protein degradation by the proteasome. *Current opinion in structural biology* **24C**: 156-164.
- Ito D, Seki M, Tsunoda Y, Uchiyama H, Suzuki N. 2011. Nuclear transport impairment of amyotrophic lateral sclerosis-linked mutations in FUS/TLS. *Annals of neurology* **69**(1): 152-162.
- Jawaid A, Murthy SB, Wilson AM, Qureshi SU, Amro MJ, Wheaton M, Simpson E, Harati Y, Strutt AM, York MK et al. 2010. A decrease in body mass index is associated with faster progression of motor symptoms and shorter survival in ALS. *Amyotrophic lateral sclerosis : official publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases* **11**(6): 542-548.

- Johnson JO, Mandrioli J, Benatar M, Abramzon Y, Van Deerlin VM, Trojanowski JQ, Gibbs JR, Brunetti M, Gronka S, Wu J et al. 2010. Exome sequencing reveals VCP mutations as a cause of familial ALS. *Neuron* **68**(5): 857-864.
- Jung C, Higgins CM, Xu Z. 2002. Mitochondrial electron transport chain complex dysfunction in a transgenic mouse model for amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neurochemistry* **83**(3): 535-545.
- Kabashi E, Agar JN, Hong Y, Taylor DM, Minotti S, Figlewicz DA, Durham HD. 2008. Proteasomes remain intact, but show early focal alteration in their composition in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neurochemistry* **105**(6): 2353-2366.
- Kabashi E, Agar JN, Taylor DM, Minotti S, Durham HD. 2004. Focal dysfunction of the proteasome: a pathogenic factor in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neurochemistry* **89**(6): 1325-1335.
- Kabuta T, Suzuki Y, Wada K. 2006. Degradation of amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant Cu,Zn-superoxide dismutase proteins by macroautophagy and the proteasome. *The Journal of biological chemistry* **281**(41): 30524-30533.
- Kalderon D. 1996. Protein degradation: de-ubiquitinate to decide your fate. *Current biology : CB* **6**(6): 662-665.
- Kawamata H, Manfredi G. 2010. Mitochondrial dysfunction and intracellular calcium dysregulation in ALS. *Mechanisms of ageing and development* **131**(7-8): 517-526.
- Kessel DH, Price M, Reiners JJ, Jr. 2012. ATG7 deficiency suppresses apoptosis and cell death induced by lysosomal photodamage. *Autophagy* **8**(9): 1333-1341.
- Kieran D, Sebastia J, Greenway MJ, King MA, Connaughton D, Concannon CG, Fenner B, Hardiman O, Prehn JH. 2008. Control of motoneuron survival by angiogenin. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **28**(52): 14056-14061.
- Kim J, Kim TY, Cho KS, Kim HN, Koh JY. 2013. Autophagy activation and neuroprotection by progesterone in the G93A-SOD1 transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of disease* **59**: 80-85.
- Kim SM, Kim H, Kim JE, Park KS, Sung JJ, Kim SH, Lee KW. 2011. Amyotrophic lateral sclerosis is associated with hypolipidemia at the presymptomatic stage in mice. *PLoS one* **6**(3): e17985.
- Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA, Jr., Emr SD, Sakai Y, Sandoval IV, Sibirny A, Subramani S, Thumm M, Veenhuis M et al. 2003. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Developmental cell* **5**(4): 539-545.
- Koga H, Kaushik S, Cuervo AM. 2010. Altered lipid content inhibits autophagic vesicular fusion. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **24**(8): 3052-3065.
- Komander D, Reyes-Turcu F, Licchesi JD, Odenwaelder P, Wilkinson KD, Barford D. 2009. Molecular discrimination of structurally equivalent Lys 63-linked and linear polyubiquitin chains. *EMBO reports* **10**(5): 466-473.
- Komatsu M, Ichimura Y. 2010. Physiological significance of selective degradation of p62 by autophagy. *FEBS letters* **584**(7): 1374-1378.
- Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E et al. 2006. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* **441**(7095): 880-884.

- Kong J, Xu Z. 1998. Massive mitochondrial degeneration in motor neurons triggers the onset of amyotrophic lateral sclerosis in mice expressing a mutant SOD1. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **18**(9): 3241-3250.
- Korolchuk VI, Menzies FM, Rubinsztein DC. 2010. Mechanisms of cross-talk between the ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome systems. *FEBS letters* **584**(7): 1393-1398.
- Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M, Weiler S, Oh KJ, Schlesinger PH. 2000. Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell death and differentiation* **7**(12): 1166-1173.
- Kouroku Y, Fujita E, Tanida I, Ueno T, Isoai A, Kumagai H, Ogawa S, Kaufman RJ, Kominami E, Momoi T. 2007. ER stress (PERK/eIF2alpha phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. *Cell death and differentiation* **14**(2): 230-239.
- Koyama S, Arawaka S, Chang-Hong R, Wada M, Kawanami T, Kurita K, Kato M, Nagai M, Aoki M, Itoyama Y et al. 2006. Alteration of familial ALS-linked mutant SOD1 solubility with disease progression: its modulation by the proteasome and Hsp70. *Biochemical and biophysical research communications* **343**(3): 719-730.
- Kristensen AR, Schandorff S, Hoyer-Hansen M, Nielsen MO, Jaattela M, Dengjel J, Andersen JS. 2008. Ordered organelle degradation during starvation-induced autophagy. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **7**(12): 2419-2428.
- Kroemer G, Marino G, Levine B. 2010. Autophagy and the integrated stress response. *Molecular cell* **40**(2): 280-293.
- Lai C, Xie C, McCormack SG, Chiang HC, Michalak MK, Lin X, Chandran J, Shim H, Shimoji M, Cookson MR et al. 2006. Amyotrophic lateral sclerosis 2-deficiency leads to neuronal degeneration in amyotrophic lateral sclerosis through altered AMPA receptor trafficking. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **26**(45): 11798-11806.
- LaManna JC, Salem N, Puchowicz M, Erokwu B, Koppaka S, Flask C, Lee Z. 2009. Ketones suppress brain glucose consumption. *Advances in experimental medicine and biology* **645**: 301-306.
- Lee Y, Morrison BM, Li Y, Lengacher S, Farah MH, Hoffman PN, Liu Y, Tsingalia A, Jin L, Zhang PW et al. 2012. Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature* **487**(7408): 443-448.
- Li L, Zhang X, Le W. 2008a. Altered macroautophagy in the spinal cord of SOD1 mutant mice. *Autophagy* **4**(3): 290-293.
- Li S, Yu W, Hu GF. 2012. Angiogenin inhibits nuclear translocation of apoptosis inducing factor in a Bcl-2-dependent manner. *Journal of cellular physiology* **227**(4): 1639-1644.
- Li X, Li H, Li XJ. 2008b. Intracellular degradation of misfolded proteins in polyglutamine neurodegenerative diseases. *Brain research reviews* **59**(1): 245-252.
- Ligon LA, LaMonte BH, Wallace KE, Weber N, Kalb RG, Holzbaur EL. 2005. Mutant superoxide dismutase disrupts cytoplasmic dynein in motor neurons. *Neuroreport* **16**(6): 533-536.
- Lilienbaum A. 2013. Relationship between the proteasomal system and autophagy. *International journal of biochemistry and molecular biology* **4**(1): 1-26.

- Lincecum JM, Vieira FG, Wang MZ, Thompson K, De Zutter GS, Kidd J, Moreno A, Sanchez R, Carrion IJ, Levine BA et al. 2010. From transcriptome analysis to therapeutic anti-CD40L treatment in the SOD1 model of amyotrophic lateral sclerosis. *Nature genetics* **42**(5): 392-399.
- Lindauer E, Dupuis L, Muller HP, Neumann H, Ludolph AC, Kassubek J. 2013. Adipose Tissue Distribution Predicts Survival in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PloS one* **8**(6): e67783.
- Liu-Yesucevitz L, Bilgutay A, Zhang YJ, Vanderweyde T, Citro A, Mehta T, Zaarur N, McKee A, Bowser R, Sherman M et al. 2010. Tar DNA binding protein-43 (TDP-43) associates with stress granules: analysis of cultured cells and pathological brain tissue. *PloS one* **5**(10): e13250.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**(4): 402-408.
- Lopez-Miranda J, Perez-Jimenez F, Ros E, De Caterina R, Badimon L, Covas MI, Escrich E, Ordovas JM, Soriguer F, Abia R et al. 2010. Olive oil and health: summary of the II international conference on olive oil and health consensus report, Jaen and Cordoba (Spain) 2008. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **20**(4): 284-294.
- Lynch-Day MA, Klionsky DJ. 2010. The Cvt pathway as a model for selective autophagy. *FEBS letters* **584**(7): 1359-1366.
- Ma X, Liu H, Foyil SR, Godar RJ, Weinheimer CJ, Hill JA, Diwan A. 2012. Impaired autophagosome clearance contributes to cardiomyocyte death in ischemia/reperfusion injury. *Circulation* **125**(25): 3170-3181.
- Mackenzie IR, Rademakers R, Neumann M. 2010. TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Lancet neurology* **9**(10): 995-1007.
- Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. 2007. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nature reviews Molecular cell biology* **8**(9): 741-752.
- Manjithaya R, Subramani S. 2011. Autophagy: a broad role in unconventional protein secretion? *Trends in cell biology* **21**(2): 67-73.
- Mantovani S, Garbelli S, Pasini A, Alimonti D, Perotti C, Melazzini M, Bendotti C, Mora G. 2009. Immune system alterations in sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients suggest an ongoing neuroinflammatory process. *Journal of neuroimmunology* **210**(1-2): 73-79.
- Marin B, Desport JC, Kajeu P, Jesus P, Nicolaud B, Nicol M, Preux PM, Couratier P. 2011. Alteration of nutritional status at diagnosis is a prognostic factor for survival of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* **82**(6): 628-634.
- Marino G, Niso-Santano M, Baehrecke EH, Kroemer G. 2014. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nature reviews Molecular cell biology* **15**(2): 81-94.
- Martinez-Gonzalez MA, Sanchez-Villegas A, De Irala J, Marti A, Martinez JA. 2002. Mediterranean diet and stroke: objectives and design of the SUN project. Seguimiento Universidad de Navarra. *Nutr Neurosci* **5**(1): 65-73.
- Maruyama H, Morino H, Ito H, Izumi Y, Kato H, Watanabe Y, Kinoshita Y, Kamada M, Nodera H, Suzuki H et al. 2010. Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* **465**(7295): 223-226.
- Mattson MP, Cutler RG, Camandola S. 2007. Energy intake and amyotrophic lateral sclerosis. *Neuromolecular medicine* **9**(1): 17-20.

- McEwan DG, Dikic I. 2011. The Three Musketeers of Autophagy: phosphorylation, ubiquitylation and acetylation. *Trends in cell biology* **21**(4): 195-201.
- Mei S, Ni HM, Manley S, Bockus A, Kassel KM, Luyendyk JP, Copple BL, Ding WX. 2011. Differential roles of unsaturated and saturated fatty acids on autophagy and apoptosis in hepatocytes. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **339**(2): 487-498.
- Mizushima N, Komatsu M. 2011. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* **147**(4): 728-741.
- Morahan JM, Yu B, Trent RJ, Pamphlett R. 2009. A genome-wide analysis of brain DNA methylation identifies new candidate genes for sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic lateral sclerosis : official publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases* **10**(5-6): 418-429.
- Mukhopadhyay S, Panda PK, Sinha N, Das DN, Bhutia SK. 2014. Autophagy and apoptosis: where do they meet? *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* **19**(4): 555-566.
- Murakami Y, Matsufuji S, Kameji T, Hayashi S, Igarashi K, Tamura T, Tanaka K, Ichihara A. 1992. Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination. *Nature* **360**(6404): 597-599.
- Murata S, Yashiroda H, Tanaka K. 2009. Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nature reviews Molecular cell biology* **10**(2): 104-115.
- Musaro A. 2010. State of the art and the dark side of amyotrophic lateral sclerosis. *World journal of biological chemistry* **1**(5): 62-68.
- Muscaritoli M, Kushta I, Molino A, Inghilleri M, Sabatelli M, Rossi Fanelli F. 2012. Nutritional and metabolic support in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Nutrition* **28**(10): 959-966.
- Naniche N, Sau D, Pasinelli P. 2011. In vivo and in vitro determination of cell death markers in neurons. *Methods Mol Biol* **793**: 9-21.
- Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, Bruce J, Schuck T, Grossman M, Clark CM et al. 2006. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* **314**(5796): 130-133.
- Nowicki M, Serke H, Kosacka J, Muller K, Spanel-Borowski K. 2010. Oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) induces cell death in neuroblastoma and survival autophagy in schwannoma cells. *Experimental and molecular pathology* **89**(3): 276-283.
- Ogata M, Hino S, Saito A, Morikawa K, Kondo S, Kanemoto S, Murakami T, Taniguchi M, Tanii I, Yoshinaga K et al. 2006. Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Molecular and cellular biology* **26**(24): 9220-9231.
- Okamoto K, Kihira T, Kondo T, Kobashi G, Washio M, Sasaki S, Yokoyama T, Miyake Y, Sakamoto N, Inaba Y et al. 2007. Nutritional status and risk of amyotrophic lateral sclerosis in Japan. *Amyotrophic lateral sclerosis : official publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases* **8**(5): 300-304.
- Onesto E, Rusmini P, Crippa V, Ferri N, Zito A, Galbiati M, Poletti A. 2011. Muscle cells and motoneurons differentially remove mutant SOD1 causing familial amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neurochemistry* **118**(2): 266-280.
- Oral O, Oz-Arslan D, Itah Z, Naghavi A, Deveci R, Karacali S, Gozuacik D. 2012. Cleavage of Atg3 protein by caspase-8 regulates autophagy during

- receptor-activated cell death. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* **17**(8): 810-820.
- Orenstein SJ, Cuervo AM. 2010. Chaperone-mediated autophagy: molecular mechanisms and physiological relevance. *Seminars in cell & developmental biology* **21**(7): 719-726.
- Paganoni S, Deng J, Jaffa M, Cudkovic ME, Wills AM. 2011. Body mass index, not dyslipidemia, is an independent predictor of survival in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle & nerve* **44**(1): 20-24.
- Pagliarini V, Wirawan E, Romagnoli A, Ciccocanti F, Lisi G, Lippens S, Cecconi F, Fimia GM, Vandenabeele P, Corazzari M et al. 2012. Proteolysis of Ambra1 during apoptosis has a role in the inhibition of the autophagic pro-survival response. *Cell death and differentiation* **19**(9): 1495-1504.
- Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, Overvatn A, Bjorkoy G, Johansen T. 2007. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *The Journal of biological chemistry* **282**(33): 24131-24145.
- Pasinelli P, Brown RH. 2006. Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. *Nature reviews Neuroscience* **7**(9): 710-723.
- Patel BP, Safdar A, Raha S, Tarnopolsky MA, Hamadeh MJ. 2010. Caloric restriction shortens lifespan through an increase in lipid peroxidation, inflammation and apoptosis in the G93A mouse, an animal model of ALS. *PloS one* **5**(2): e9386.
- Pedrini S, Sau D, Guareschi S, Bogush M, Brown RH, Jr., Nanche N, Kia A, Trotti D, Pasinelli P. 2010. ALS-linked mutant SOD1 damages mitochondria by promoting conformational changes in Bcl-2. *Human molecular genetics* **19**(15): 2974-2986.
- Philips T, Robberecht W. 2011. Neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: role of glial activation in motor neuron disease. *Lancet neurology* **10**(3): 253-263.
- Pickart CM, Eddins MJ. 2004. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochimica et biophysica acta* **1695**(1-3): 55-72.
- Pickles S, Destroismaisons L, Peyrard SL, Cadot S, Rouleau GA, Brown RH, Jr., Julien JP, Arbour N, Vande Velde C. 2013. Mitochondrial damage revealed by immunoselection for ALS-linked misfolded SOD1. *Human molecular genetics* **22**(19): 3947-3959.
- Radoshevich L, Murrow L, Chen N, Fernandez E, Roy S, Fung C, Debnath J. 2010. ATG12 conjugation to ATG3 regulates mitochondrial homeostasis and cell death. *Cell* **142**(4): 590-600.
- Reich-Slotky R, Andrews J, Cheng B, Buchsbaum R, Levy D, Kaufmann P, Thompson JL. 2013. Body mass index (BMI) as predictor of ALSFRS-R score decline in ALS patients. *Amyotrophic lateral sclerosis & frontotemporal degeneration* **14**(3): 212-216.
- Renton AE, Majounie E, Waite A, Simon-Sanchez J, Rollinson S, Gibbs JR, Schymick JC, Laaksovirta H, van Swieten JC, Myllykangas L et al. 2011. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron* **72**(2): 257-268.
- Reyes NA, Fisher JK, Austgen K, VandenBerg S, Huang EJ, Oakes SA. 2010. Blocking the mitochondrial apoptotic pathway preserves motor neuron viability and function in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of clinical investigation* **120**(10): 3673-3679.

- Robberecht W, Philips T. 2013. The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis. *Nature reviews Neuroscience* **14**(4): 248-264.
- Rosen DR. 1993. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* **364**(6435): 362.
- Rubinstein AD, Eisenstein M, Ber Y, Bialik S, Kimchi A. 2011. The autophagy protein Atg12 associates with antiapoptotic Bcl-2 family members to promote mitochondrial apoptosis. *Molecular cell* **44**(5): 698-709.
- Rubinsztein DC. 2006. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature* **443**(7113): 780-786.
- Ryter SW, Mizumura K, Choi AM. 2014. The Impact of Autophagy on Cell Death Modalities. *International journal of cell biology* **2014**: 502676.
- Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, Walsh K, Schiaffino S, Lecker SH, Goldberg AL. 2004. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* **117**(3): 399-412.
- Sasaki S, Iwata M. 2007. Mitochondrial alterations in the spinal cord of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neuropathology and experimental neurology* **66**(1): 10-16.
- Sasaki S, Warita H, Abe K, Iwata M. 2005. Impairment of axonal transport in the axon hillock and the initial segment of anterior horn neurons in transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. *Acta neuropathologica* **110**(1): 48-56.
- Sathasivam S, Grierson AJ, Shaw PJ. 2005. Characterization of the caspase cascade in a cell culture model of SOD1-related familial amyotrophic lateral sclerosis: expression, activation and therapeutic effects of inhibition. *Neuropathology and applied neurobiology* **31**(5): 467-485.
- Sau D, De Biasi S, Vitellaro-Zuccarello L, Riso P, Guarneri S, Porrini M, Simeoni S, Crippa V, Onesto E, Palazzolo I et al. 2007. Mutation of SOD1 in ALS: a gain of a loss of function. *Human molecular genetics* **16**(13): 1604-1618.
- Saxena S, Caroni P. 2011. Selective neuronal vulnerability in neurodegenerative diseases: from stressor thresholds to degeneration. *Neuron* **71**(1): 35-48.
- Scarmeas N, Luchsinger JA, Schupf N, Brickman AM, Cosentino S, Tang MX, Stern Y. 2009. Physical activity, diet, and risk of Alzheimer disease. *JAMA* **302**(6): 627-637.
- Schmitt F, Hussain G, Dupuis L, Loeffler JP, Henriques A. 2014. A plural role for lipids in motor neuron diseases: energy, signaling and structure. *Frontiers in cellular neuroscience* **8**: 25.
- Schroder M, Kaufman RJ. 2005. The mammalian unfolded protein response. *Annual review of biochemistry* **74**: 739-789.
- Shaid S, Brandts CH, Serve H, Dikic I. 2013. Ubiquitination and selective autophagy. *Cell death and differentiation* **20**(1): 21-30.
- Shaw PJ, Ince PG, Falkous G, Mantle D. 1995. Oxidative damage to protein in sporadic motor neuron disease spinal cord. *Annals of neurology* **38**(4): 691-695.
- Shen S, Kepp O, Kroemer G. 2012. The end of autophagic cell death? *Autophagy* **8**(1): 1-3.
- Shibata N, Nagai R, Uchida K, Horiuchi S, Yamada S, Hirano A, Kawaguchi M, Yamamoto T, Sasaki S, Kobayashi M. 2001. Morphological evidence for lipid peroxidation and protein glycoxidation in spinal cords from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Brain research* **917**(1): 97-104.

- Shimizu T, Nagaoka U, Nakayama Y, Kawata A, Kugimoto C, Kuroiwa Y, Kawai M, Shimohata T, Nishizawa M, Mihara B et al. 2012. Reduction rate of body mass index predicts prognosis for survival in amyotrophic lateral sclerosis: a multicenter study in Japan. *Amyotrophic lateral sclerosis : official publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases* **13**(4): 363-366.
- Shravage BV, Hill JH, Powers CM, Wu L, Baehrecke EH. 2013. Atg6 is required for multiple vesicle trafficking pathways and hematopoiesis in *Drosophila*. *Development* **140**(6): 1321-1329.
- Singh R, Cuervo AM. 2012. Lipophagy: connecting autophagy and lipid metabolism. *International journal of cell biology* **2012**: 282041.
- Singh R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, Komatsu M, Tanaka K, Cuervo AM, Czaja MJ. 2009. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* **458**(7242): 1131-1135.
- Strucksberg KH, Tangavelou K, Schroder R, Clemen CS. 2010. Proteasomal activity in skeletal muscle: a matter of assay design, muscle type, and age. *Analytical biochemistry* **399**(2): 225-229.
- Tan W, Nanche N, Bogush A, Pedrini S, Trotti D, Pasinelli P. 2013. Small peptides against the mutant SOD1/Bcl-2 toxic mitochondrial complex restore mitochondrial function and cell viability in mutant SOD1-mediated ALS. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **33**(28): 11588-11598.
- Tateno M, Kato S, Sakurai T, Nukina N, Takahashi R, Araki T. 2009. Mutant SOD1 impairs axonal transport of choline acetyltransferase and acetylcholine release by sequestering KAP3. *Human molecular genetics* **18**(5): 942-955.
- Thau N, Knippenberg S, Korner S, Rath KJ, Dengler R, Petri S. 2012. Decreased mRNA expression of PGC-1alpha and PGC-1alpha-regulated factors in the SOD1G93A ALS mouse model and in human sporadic ALS. *Journal of neuropathology and experimental neurology* **71**(12): 1064-1074.
- Trotti D, Rolfs A, Danbolt NC, Brown RH, Jr., Hediger MA. 1999. SOD1 mutants linked to amyotrophic lateral sclerosis selectively inactivate a glial glutamate transporter. *Nature neuroscience* **2**(9): 848.
- Turner SL, Li N, Guda T, Githure J, Carde RT, Ray A. 2011. Ultra-prolonged activation of CO2-sensing neurons disorients mosquitoes. *Nature* **474**(7349): 87-91.
- Tyedmers J, Mogk A, Bukau B. 2010. Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nature reviews Molecular cell biology* **11**(11): 777-788.
- Van Damme P, Dewil M, Robberecht W, Van Den Bosch L. 2005. Excitotoxicity and amyotrophic lateral sclerosis. *Neuro-degenerative diseases* **2**(3-4): 147-159.
- Vande Velde C, Miller TM, Cashman NR, Cleveland DW. 2008. Selective association of misfolded ALS-linked mutant SOD1 with the cytoplasmic face of mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**(10): 4022-4027.
- Venkatachalam K, Long AA, Elsaesser R, Nikolaeva D, Broadie K, Montell C. 2008. Motor deficit in a *Drosophila* model of mucopolipidosis type IV due to defective clearance of apoptotic cells. *Cell* **135**(5): 838-851.
- Wirawan E, Vande Walle L, Kersse K, Cornelis S, Claerhout S, Vanoverberghe I, Roelandt R, De Rycke R, Verspurten J, Declercq W et al. 2010. Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy

- and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria. *Cell death & disease* **1**: e18.
- Wong E, Cuervo AM. 2010. Integration of clearance mechanisms: the proteasome and autophagy. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2**(12): a006734.
- Wong M, Martin LJ. 2010. Skeletal muscle-restricted expression of human SOD1 causes motor neuron degeneration in transgenic mice. *Human molecular genetics* **19**(11): 2284-2302.
- Wong PC, Pardo CA, Borchelt DR, Lee MK, Copeland NG, Jenkins NA, Sisodia SS, Cleveland DW, Price DL. 1995. An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron* **14**(6): 1105-1116.
- Wu DC, Re DB, Nagai M, Ischiropoulos H, Przedborski S. 2006. The inflammatory NADPH oxidase enzyme modulates motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**(32): 12132-12137.
- Xie Z, Nair U, Klionsky DJ. 2008. Atg8 controls phagophore expansion during autophagosome formation. *Molecular biology of the cell* **19**(8): 3290-3298.
- Yang Y, Gozen O, Watkins A, Lorenzini I, Lepore A, Gao Y, Vidensky S, Brennan J, Poulsen D, Won Park J et al. 2009. Presynaptic regulation of astroglial excitatory neurotransmitter transporter GLT1. *Neuron* **61**(6): 880-894.
- Yang Y, Hentati A, Deng HX, Dabbagh O, Sasaki T, Hirano M, Hung WY, Ouahchi K, Yan J, Azim AC et al. 2001. The gene encoding alsin, a protein with three guanine-nucleotide exchange factor domains, is mutated in a form of recessive amyotrophic lateral sclerosis. *Nature genetics* **29**(2): 160-165.
- Yi CX, Habegger KM, Chowen JA, Stern J, Tschop MH. 2011. A role for astrocytes in the central control of metabolism. *Neuroendocrinology* **93**(3): 143-149.
- Youle RJ, Narendra DP. 2011. Mechanisms of mitophagy. *Nature reviews Molecular cell biology* **12**(1): 9-14.
- Yousefi S, Perozzo R, Schmid I, Ziemiecki A, Schaffner T, Scapozza L, Brunner T, Simon HU. 2006. Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nature cell biology* **8**(10): 1124-1132.
- Zhang B, Tu P, Abtahian F, Trojanowski JQ, Lee VM. 1997. Neurofilaments and orthograde transport are reduced in ventral root axons of transgenic mice that express human SOD1 with a G93A mutation. *The Journal of cell biology* **139**(5): 1307-1315.
- Zhang X, Chen S, Song L, Tang Y, Shen Y, Jia L, Le W. 2014. MTOR-independent, autophagic enhancer trehalose prolongs motor neuron survival and ameliorates the autophagic flux defect in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Autophagy* **10**(4).
- Zhang X, Li L, Chen S, Yang D, Wang Y, Wang Z, Le W. 2011. Rapamycin treatment augments motor neuron degeneration in SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Autophagy* **7**(4): 412-425.
- Zhao J, Brault JJ, Schild A, Goldberg AL. 2008. Coordinate activation of autophagy and the proteasome pathway by FoxO transcription factor. *Autophagy* **4**(3): 378-380.
- Zhao W, Varghese M, Vempati P, Dzhun A, Cheng A, Wang J, Lange D, Bilski A, Faravelli I, Pasinetti GM. 2012. Caprylic triglyceride as a novel therapeutic approach to effectively improve the performance and attenuate the symptoms due to the motor neuron loss in ALS disease. *PloS one* **7**(11): e49191.

- Zhao Z, Lange DJ, Voustantiounk A, MacGrogan D, Ho L, Suh J, Humala N, Thiyagarajan M, Wang J, Pasinetti GM. 2006. A ketogenic diet as a potential novel therapeutic intervention in amyotrophic lateral sclerosis. *BMC neuroscience* **7**: 29.
- Zheng Q, Li J, Wang X. 2009. Interplay between the ubiquitin-proteasome system and autophagy in proteinopathies. *International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology* **1**(2): 127-142.
- Zhou J, Yi J, Fu R, Liu E, Siddique T, Rios E, Deng HX. 2010. Hyperactive intracellular calcium signaling associated with localized mitochondrial defects in skeletal muscle of an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of biological chemistry* **285**(1): 705-712.

ABREVIATURAS



| | |
|--------------------|---|
| A | |
| AMBRA1 | activating molecule in beclin1-regulated autophagy |
| AMC | 7-amino-4-methylcumarin |
| AMPK | AMP-activated <i>protein</i> kinase |
| ANG | Angiogenin |
| ATG | autophagy-related proteins/genes |
| B | |
| BAD | BCL-2 agonist of cell death |
| BCL-X _L | BCL extra large |
| BH | Bcl-2 homology |
| BH3 | BCL-2 homology 3 |
| BID | BH3-interacting domain death agonist |
| BNIP3 | BCL-2 and adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein |
| 3 | |
| BSA | bovine serum albumin |
| C | |
| C9ORF72 | chromosome 9 open reading frame 72 |
| cDNA | DNA complementario |
| CMA | Chaperone-mediated <i>autophagy</i> |
| CO ₂ | dióxido de carbono |
| D | |
| DAPI | 4',6-diamino-2-fenilindol |
| DAPK | death-associated <i>portein</i> kinase |
| DEPC | diethylpyrocarbonato |
| DUB | Deubiquitining enzymes |
| DUBs | Deubiquitinating <i>enzymes</i> |
| E | |
| E1 | <i>Ubiquitin-activating enzymes</i> |
| E2 | Ubiquitin-conjugating enzymes |
| E3 | Ubiquitin ligases |
| EAAT2 | Excitatory amino acid transponer 2 |
| EAAT2 | <i>Excitatory amino-acid transporter 2</i> |
| ECL | enzimatic chemiluminiscence |
| EDTA | Ethylenediaminetetraacetic acid |
| ELA | esclerosis lateral amiotrófica |
| ELAE | esclerosis lateral amiotrófica espontánea |
| ELAF | esclerosis lateral amiotrófica familiar |
| ER | retículo endoplasmatico |
| ER | Retículo endoplasmático |
| F | |
| FADD | FAS associated dearth domain |
| FIP200 | FAK family kinase-interacting protein of 200 kDa o Atg7 |
| G | |
| GAPDH | gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa |

| | |
|-----------------|---|
| H | |
| HRP | <i>horseradish peroxidase</i> |
| I | |
| IAP | inhibitor of apoptosis proteins |
| IAPs | Inhibitor of apoptosis <i>proteins</i> |
| J | |
| JNK | JUN N-terminal kinase |
| L | |
| LAMP | lysosomal-associated membrane proteins |
| LC3 | microtubule-associated protein 1 light chain 3 |
| LIR | LC3-interacting region |
| M | |
| MCL1 | myeloid cell leukemia sequence 1 |
| MOMP | mitochondrial outer membrane permeabilization |
| mTORC1 | mammalian target of rapamycin complex 1 |
| N | |
| NF- κ B | nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B |
| cell | |
| NIX | NIP3-like protein X |
| P | |
| p62/SQSTM1 | sequestosome 1 |
| PBS | buffer fosfato salino |
| PCR | Polimerasa chain reaction |
| PERK | <i>protein</i> kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase |
| PKD | protein kinase D |
| PQC | control of proteín quality |
| PtdIns3K o PI3K | phosphatidylinositol-3-OH kinase |
| PVDF | polifluoruro de vinilideno |
| R | |
| RIP | ribosome-inactivating <i>protein</i> |
| ROS | <i>Reactive Oxygen Species</i> |
| S | |
| SDS | sodium dodecyl sulfato |
| SDS-PGE | sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis |
| SEM | error estándar de la media |
| SETX | senataxin |
| SNARE | Soluble NSF Attachment Protein REceptor |
| SOD1 | Superoxide dismutase [Cu-Zn] |
| T | |
| TBS | buffer tris salino |
| TDP-43 | TAR DNA-binding protein 43 |

| | |
|----------|--|
| TdT | terminal deoxynucleotidyl transferase |
| TEMED | N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina |
| T | |
| TNFR1 | tumour necrosis factor receptor 1 |
| TRADD | TNFR1-associated death domain |
| TRAIL | TNF-related apoptosis-inducing ligand |
| TUNEL | terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling |
| U | |
| UBA | ubiquitin-associated |
| UBD | ubiquitin-associated (<i>UBA</i>) domain |
| UBL | ubiquitin-like |
| UPR | Unfolded-protein response |
| UPS | ubiquitin-proteasome system |
| UPS | Ubiquitin- <i>proteasome</i> system |
| V | |
| VAPB | vesicle-associated membrane protein B |
| VCP | valosin-containing <i>protein</i> |
| VPS34 | vacuolar protein sorting 34 |
| W | |
| WT | wild-type |
| X | |
| XBP1 | x-box bindi |

