

## Trabajo Fin de Máster

# Estudio de la unión neuromuscular en el origen patogénico de la ELA

Study of the neuromuscular  
junction in the onset of ALS  
pathology

Autor

**Andrés Jiménez Zúñiga**

Directores

**Gorka Gereñu Lopetegi**

**Francisco Javier Gil Bea**

Instituto de investigación sanitaria Biodonostia

Departamento de Neurociencias

Curso 2019-2020 – Máster en Biología Molecular y Celular

## Resumen

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa progresiva que afecta rápidamente a las motoneuronas del cerebro y la médula espinal. Esta enfermedad, a día de hoy, no tiene cura. En alrededor del 90% de los casos el origen de la enfermedad es desconocido, pero en un 10% está causada por mutaciones genéticas de herencia mendeliana en más de 20 genes, entre los que destacan TARBDP, que codifica para TDP-43, y FUS. Recientes hallazgos han cuestionado el origen neurogénico de la enfermedad para situarlo en las células sostén de las motoneuronas dentro del sistema neuromuscular, como lo son las células de la glía y las células del músculo esquelético. Con el objetivo de tratar de esclarecer si el origen patogénico en la motoneurona es suficiente para causar enfermedad de ELA se ha llevado a cabo la generación y caracterización de dos modelos de *Drosophila melanogaster* que reproducen uno de los principales detonantes de la enfermedad, la pérdida de función del ortólogo de TDP-43 (*Tbph*) o FUS (*Caz*), en motoneurona mediante el silenciamiento condicionado de dichos genes en este tipo celular. Además, se ha comprobado la validez de estos modelos para ensayos de testado farmacológico usando un tratamiento con demostrada capacidad de proteger frente a los efectos de la disfunción de TDP-43 y FUS: la inhibición de FoxO. Los resultados muestran un déficit locomotor característico de la ELA en el modelo generado con el promotor de la proteína OK6, sin variaciones acordes en su longevidad. Dicho modelo fue tratado con un inhibidor selectivo de FoxO, AS1842856, el cual fue capaz de mitigar las anomalías locomotoras detectadas en las moscas con silenciamiento de *Tbph*. A falta de realizar estudios histopatológicos que demuestren neurodegeneración de motoneurona, se puede extraer de los presentes resultados que los modelos de inducción de pérdida de función de *Tbph* y *Caz* en motoneurona de *Drosophila* son capaces de provocar fenotipos compatibles con la ELA, y por tanto son legítimos para realizar tratamientos farmacológicos. Además, la inhibición de los factores de transcripción FoxO a nivel de motoneurona tiene efectos beneficiosos como tratamiento de la enfermedad.

## Abstract

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a progressive neurodegenerative disease that rapidly affects motor neurons in the brain and spinal cord. This disease, up to date, has no cure. In about 90% of cases the origin of the disease is unknown, but in 10% it is caused by Mendelian inherited genetic mutations in more than 20 genes, among which TARBDP, which codes for TDP-43, and FUS stand out. Recent findings have questioned the neurogenic origin of the disease to place it in the supporting cells of the motor neurons within the neuromuscular system, such as the cells of the glia and the cells of the skeletal muscle. With the aim of trying to clarify whether the pathogenic origin in the motor neuron is sufficient to cause ALS disease, the generation and characterization of two models of *Drosophila melanogaster* that reproduce one of the main triggers of the disease have been carried out, the loss of function of the ortholog of TDP-43 (*Tbph*) or FUS (*Caz*), in motor neuron by means of the conditioned silencing of those genes in this cell type. Furthermore, the validity of these models for pharmacological testing has been verified by using a treatment with proven ability to protect against the effects of TDP-43 and FUS dysfunction: FoxO inhibition. The results show a characteristic locomotor deficit of ALS in the model generated with the promoter of the OK6 protein, without consistent variations in its longevity. This model was treated with a selective FoxO inhibitor, AS1842856, which was able to mitigate the locomotor abnormalities detected in the flies with *Tbph* silencing. In the absence of histopathological studies that demonstrate motor neuron neurodegeneration, it can be extracted from the present results that the models of induction of loss of function of *Tbph* and *Caz* in *Drosophila* motor neurons are capable of causing phenotypes compatible with ALS, and therefore are legitimate to carry out pharmacological treatments. Furthermore, the inhibition of FoxO transcription factors at the motor neuron level has beneficial effects as a treatment for the disease.

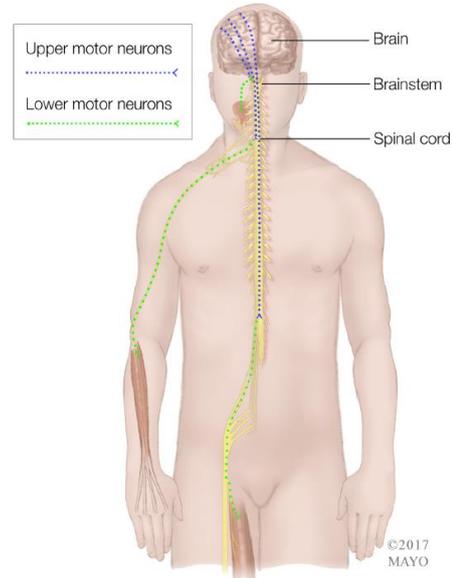
## Contenido

<b>1. Introducción</b>	1
1.1. Epidemiología	2
1.2. Patofisiología y etiología de la ELA	3
1.2.1. Factores genéticos para padecer ELA	5
1.2.2. Factores de riesgo ambientales para padecer ELA	10
1.3. Mecanismos de toxicidad autónomos y no autónomos de la motoneurona	12
1.4. Tratamiento de la ELA	14
1.4.1. FoxO como posible diana terapéutica para la ELA	14
1.5. <i>Drosophila melanogaster</i> como modelo <i>in vivo</i> para el estudio de la ELA	16
1.5.1. Modelos de ELA en <i>Drosophila melanogaster</i>	19
<b>2. Hipótesis y objetivos</b>	21
<b>3. Materiales y métodos</b>	23
3.1. Mantenimiento del modelo de <i>Drosophila melanogaster</i>	23
3.2. Técnica de silenciamiento en mosca	24
3.3. Obtención de nuevos modelos de <i>Drosophila melanogaster</i>	24
3.3.1. Ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i>	24
3.3.2. Genética de <i>Drosophila melanogaster</i>	25
3.3.3. Diseño de cruces	26
3.3.4. Genotipos utilizados en la realización de los cruces	29
3.4. Ensayo de longevidad	30
3.5. Ensayo de actividad locomotora	31
3.6. Extracción proteica	31
3.7. Western Blot	32
<b>4. Resultados</b>	33
4.1. Obtención de modelos con silenciamiento de <i>Tbph</i> y <i>Caz</i> en motoneurona	33
4.1.1. Generación del modelo OK6/Dcr-2	33
4.1.2. Generación del modelo D42/Dcr-2	37
4.1.3. Generación de moscas experimentales con silenciamiento en motoneurona	37
4.2. Confirmación del silenciamiento de <i>Tbph</i> mediante ensayo de western blot	39
4.3. Ensayo locomotor	40
4.3.1. Ensayo motor en tratamiento con inhibidor de factores de transcripción FoxO	44
4.4. Ensayo de longevidad	45
<b>5. Discusión</b>	48
<b>6. Conclusiones</b>	54
<b>7. Bibliografía</b>	56

## 1. Introducción

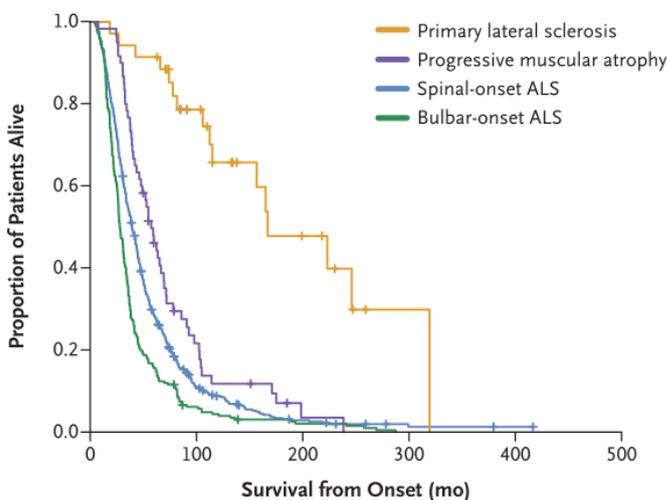
La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa heterogénea caracterizada por la degeneración de motoneuronas superiores (neuronas que conectan el córtex con el tronco encefálico y la médula espinal) e inferiores (conectan el tronco encefálico o la médula espinal con los músculos efectores) (Fig. 1).

<sup>1,2</sup> Comienza con la aparición de cierta debilidad muscular localizada que poco a poco se extiende a la gran mayoría de músculos del cuerpo, incluyendo el diafragma. Sin embargo, estos síntomas iniciales pueden variar entre pacientes, pudiendo presentar debilidad en los músculos de las extremidades o, en otros casos, disartria (dificultad para articular sonidos o palabras) o disfagia (dificultad para la deglución).



**Figura 1.** Conexión entre motoneuronas superiores, inferiores y músculo efector. <sup>2</sup>

En función de la zona inicialmente afectada existen tres tipos de ELA: la forma medular, periférica o espinal (extremidades, 70%); la forma bulbar (músculos de la boca, 25% de los casos), que es más agresiva y con menor esperanza de vida; y la forma respiratoria (órganos respiratorios, 5%) (Fig. 2). A pesar de que estos primeros síntomas están relacionados con la función motora, alrededor del 50% de pacientes desarrollan problemas cognitivos o de comportamiento, y un 13% muestran síntomas de demencia



frontotemporal (DFT). La muerte suele tener lugar a los 3-5 años por parálisis respiratoria. <sup>1,3</sup>

**Figura 2.** Curvas de supervivencia de pacientes con 2 tipos de ELA (espinal y bulbar) y otras dos enfermedades que afectan a las motoneuronas (esclerosis lateral primaria y atrofia muscular progresiva). <sup>3</sup>

## 1.1. Epidemiología

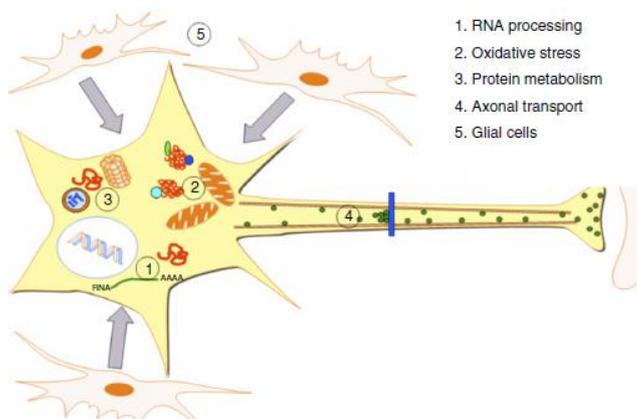
En la década de 1990 el número de casos reportados de ELA en Europa era de alrededor de 1,5-2,7 por cada 100.000 habitantes. Estudios recientes muestran que la prevalencia de esta enfermedad no ha aumentado, sino que se mantiene estable.<sup>4</sup> La incidencia de la ELA varía en función de los orígenes ancestrales, es decir, existen diferencias en el número de casos registrados según las distintas zonas geográficas. Por ejemplo, así como Europa presenta 2-3 casos por cada 100.000 habitantes, en Asia se han registrado 0,7-0,8 dependiendo de la región. En áreas en las que la población es heterogénea, el número de casos es inferior a 1 por cada 100.000 individuos, mientras que en zonas de población homogénea (como Irlanda, Escocia o Islas Feroe) el número aumenta a 2,6. Por otra parte, se han observado diferencias en el fenotipo de la enfermedad en función de la población, presentando un mayor tiempo medio de supervivencia en Asia (48 meses) que en Europa (24 meses). Finalmente, el porcentaje de individuos que presentan la forma bulbar de la enfermedad es mucho menor en Asia que en Europa y, además, se han observado diferencias entre norte y sur de Europa, existiendo un mayor porcentaje de casos de la forma espinal en el sur.<sup>1</sup>

Alrededor del 90% de los casos de la enfermedad se deben a causas desconocidas (ELA esporádica), mientras que el 10% restante es debida a mutaciones en genes de herencia mendeliana (ELA familiar), algunos de ellos con relevancia biológica en tejidos no neuronales que desempeñan distintas funciones. En el caso de la ELA esporádica se ha observado que la proporción de afectados entre hombres y mujeres es de 2:1, mientras que en el caso de la ELA familiar es de 1:1.<sup>3</sup> Por otra parte, atendiendo a diferencias epidemiológicas entre ambos géneros, las mujeres muestran una mayor predisposición a presentar la forma bulbar de la enfermedad.<sup>1</sup>

La edad a la que se da la aparición de la enfermedad suele estar entre 50 y 65 años. Únicamente el 5% de los casos se dan en personas con menos de 30 años. La incidencia de la ELA es mucho mayor en personas de 80 años en adelante (10,2 en hombres y 6,1 en mujeres por cada 100.000 personas), por lo que se considera una enfermedad neurodegenerativa en la que la edad supone un importante factor de riesgo.<sup>4</sup>

## 1.2. Patofisiología y etiología de la ELA

La patología de la ELA se caracteriza por la muerte de las motoneuronas en la corteza motora y la médula espinal. En el caso de la ELA-DFT la degeneración de las neuronas está más extendida, expandiéndose al lóbulo frontal y temporal. Los procesos patológicos asociados a la degeneración de la motoneurona no diferencian las formas familiares de las esporádicas, e incluyen un rango diverso de afectaciones celulares, como alteraciones en el procesamiento de RNA, aumento del estrés oxidativo, trastornos en el metabolismo proteico, defectos en el transporte axonal, desórdenes sinápticos, excitotoxicidad y alteración del ambiente de las motoneuronas (Fig. 3).<sup>5,6</sup>



**Figura 3.** Alteraciones patológicas en la ELA. **1)** Alteraciones en el procesamiento de RNA, dando lugar a RNA tóxico o aberrante. **2)** Estrés oxidativo. **3)** Afectaciones en el metabolismo proteico asociadas con la disfunción del sistema ubiquitin-proteasoma (UPS). **4)** Alteraciones en las proteínas de transporte axonales. **5)** Alteraciones en células de la glia conduciendo a la degeneración de la motoneurona.<sup>5</sup>

Una gran cantidad de proteínas asociadas con la ELA están directa o indirectamente asociadas con el procesamiento de ácidos nucleicos. El descubrimiento de mutaciones en proteínas implicadas en el metabolismo de RNA, como SMN1, TDP-43 y FUS, confirman que puede tener una contribución en la patogénesis de la ELA.<sup>7</sup> Otra afectación que tiene lugar a nivel de motoneurona es el aumento del estrés oxidativo, provocado por un desequilibrio entre la generación de radicales libres y su eliminación, o por la incapacidad de solventar el daño causado por este estrés. Varios estudios afirman que el estrés oxidativo está implicado en la patogénesis de la ELA, encontrándose un nivel elevado de marcadores del mismo en muestras de pacientes.<sup>8,9</sup>

Histopatológicamente esta enfermedad se caracteriza por la patología TDP-43, presentando una característica agregación citoplasmática de la proteína TDP-43 con co-localización de p62 y ubiquitina,<sup>10</sup> principalmente en motoneuronas, pero también en células de la glía.<sup>3</sup> Estas inclusiones ubiquitinadas citoplasmáticas son la señal de identidad patogénica de la ELA y destacan una afectación en el metabolismo proteico.<sup>6</sup>

La síntesis de RNA ribosomal y proteínas tiene lugar en el nucleolo y el retículo endoplasmático, respectivamente. El estrés celular induce una respuesta de estrés del retículo endoplasmático, caracterizada por una disgregación del mismo y una acumulación de proteínas aberrantes en las inclusiones citoplasmáticas. Esta disgregación provoca alteraciones en la capacidad de síntesis proteica, dando lugar a la activación de mecanismos apoptóticos.<sup>11</sup> Los ribosomas constituyen una parte fundamental del retículo endoplasmático rugoso, siendo esenciales para el mantenimiento estructural y funcional de este orgánulo. El proceso de síntesis ribosomal es regulado y mediado por el nucleolo,<sup>12</sup> por ello, el nucleolo juega un papel fundamental en la respuesta al estrés del retículo endoplasmático.<sup>13</sup> Dentro de la célula, el reciclaje proteico es llevado a cabo por el sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) y la ruta autofágica lisosomal (que se activa en situaciones en las que UPS se encuentra saturado por la degradación de proteínas plegadas o de gran tamaño). La autofagia es un proceso extremadamente regulado, pero una actuación descontrolada del mismo puede ser muy dañino para la célula. En este contexto, se ha visto que en modelos de ratón de ELA y en pacientes tiene lugar un colapso del UPS y una respuesta autofágica descontrolada.<sup>6,14</sup> De hecho, el tratamiento con moduladores proteostáticos ejerce efectos neuroprotectores en modelos experimentales de ELA.<sup>15</sup> Se desconoce si los defectos en la degradación proteica tienen su origen en UPS o en la autofagia, aunque ciertas investigaciones sugieren que las neuronas tienen mayor sensibilidad a los fallos en UPS.<sup>16,17</sup>

Debido a la longitud de los axones de las motoneuronas, el transporte axonal dependiente de ATP tiene especial relevancia en la biología de estas células. Es necesario para aportar los componentes celulares necesarios al terminal presináptico. La maquinaria del transporte axonal engloba microtúbulos y proteínas motoras (quinesinas y dineínas) que se asocian a ellos.<sup>6</sup> Estudios en modelos mutantes de SOD1 de ratón han reportado alteraciones en el transporte en etapas tempranas de la ELA, estando especialmente comprometido el transporte anterógrado (transporte de moléculas u orgánulos del cuerpo celular hacia la sinapsis) de mitocondrias.<sup>18</sup> Tradicionalmente se ha pensado que los defectos en el transporte axonal eran un efecto secundario de múltiples desórdenes, como una insuficiente producción de ATP,<sup>19</sup> sin embargo, se han

encontrado mutaciones en genes que codifican para proteínas que actúan de forma directa en el transporte.<sup>20</sup>

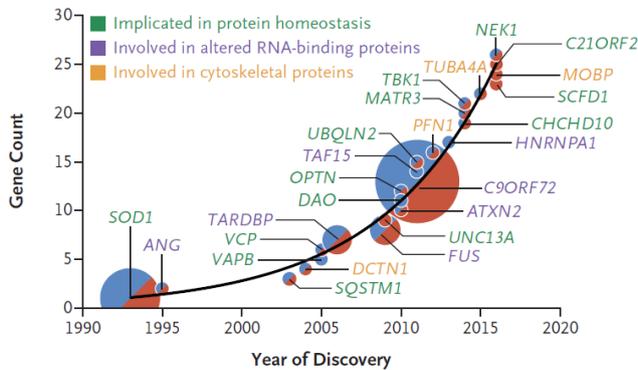
La degeneración de la motoneurona viene acompañada de procesos neuroinflamatorios, los cuales están empezando a ser considerados la causa del daño neuronal y no una consecuencia del mismo.<sup>21</sup> La neuroinflamación da lugar a la proliferación y activación de astrogliá, microglía y oligodendrocitos, que secretan especies reactivas de oxígeno y citoquinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$  e IL6).<sup>22</sup> En 1993 la activación de la microglía se asoció con la infiltración de células Th y Tc en la médula espinal y la corteza motora de pacientes de ELA.<sup>23</sup> Las células Th reactivan los astrocitos y la microglía dando lugar a un fenotipo M1, pasando de llevar a cabo una función neuroprotectora a una neurotóxica.<sup>24</sup> Además, en muestras de sangre de pacientes y modelos animales de ELA se ha reportado un bajo nivel de células T reguladoras, que promueven el fenotipo M2 neuroprotector en microglía.<sup>21,25</sup> Por todo ello, es posible que la respuesta inmune fisiológica frente a patógenos pase a ser patológica en personas con ELA.

Las causas que dan lugar al desarrollo de la ELA son desconocidas en la gran mayoría de pacientes. Actualmente, se considera que para que se manifieste la enfermedad deben ocurrir múltiples eventos de forma secuencial.<sup>26</sup> Estos eventos incluyen por una parte factores genéticos y, por otra, factores ambientales.<sup>27</sup>

#### 1.2.1. Factores genéticos para padecer ELA

En los últimos años se han logrado llevar a cabo importantes progresos en el descubrimiento de la etiología genética de la ELA. En el año 1993 se descubrió el primer gen implicado en el desarrollo de la enfermedad, SOD1.<sup>28</sup> Posteriormente, la proteína TDP-43 fue identificada como uno de los constituyentes principales de los agregados proteicos localizados en las motoneuronas de los pacientes de ELA. Además, se encontraron mutaciones en el gen TARBDP, que codifica para TDP-43, asociadas al desarrollo de la enfermedad. Más adelante, se identificaron los genes FUS Y C9orf72 como posibles causantes de la ELA.<sup>29</sup> Estos son los principales genes conocidos hasta el momento cuyas mutaciones pueden dar lugar al desarrollo de la enfermedad, estando implicados en alrededor del 70% de los casos de ELA familiar. Además de estos genes se han identificado otros como SQSTM1, OPTN, VCP...<sup>28</sup>

Estos genes se pueden dividir en 3 grupos según su función: implicación en la homeostasis proteica, proteínas citoesqueléticas y proteínas de unión a RNA. Como vemos en la gráfica (Fig. 4), el 45% de los casos de la ELA familiar están asociados a mutaciones en el gen C9orf72, seguido de un 20% de casos relacionados con SOD1.



Mutaciones en FUS y TARBDP aparecen en un porcentaje relativamente alto de pacientes de ELA. Finalmente, vemos que existen gran cantidad de genes reportados que parecen tener una menor incidencia en el desarrollo de la enfermedad.<sup>3</sup>

**Figura 4.** Descubrimiento de genes relacionados con le ELA desde 1990. El tamaño los círculos refleja la proporción de casos de ELA familiar asociados a cada gen. Los círculos azules indican genes relacionados con la ELA familiar, los rojos con la ELA esporádica y los azules/rojos con ambas.

A continuación, se describen los principales genes relacionados con la ELA y las mutaciones que provocan el desarrollo de la misma:

1. **SOD1**: Gen ubicado en posición 21q22.11 que codifica para la proteína monomérica superóxido dismutasa (SOD). Esta enzima une a iones de hierro y cobre y se encarga de la destrucción de radicales libres de superóxido.<sup>30</sup> Se han reportado más de 100 mutaciones de riesgo en este gen que dan lugar mayoritariamente a la ELA familiar, aunque en un menor número de caso a la ELA esporádica. Existe una amplia heterogeneidad en el fenotipo resultante en función de las distintas mutaciones del gen. Por ejemplo, la mutación A4V (la más frecuente en Norte América) da lugar a una ELA muy agresiva que provoca la muerte en cuestión de un año desde el comienzo de los síntomas. Por otro lado, la mutación D90A en homocigosis en este mismo gen da lugar a un curso indolente, provocando la muerte del paciente a los 10 años por fallo respiratorio. Esta enfermedad no se caracteriza por provocar trastornos cognitivos, sin embargo, pacientes con esta mutación presentan dichos trastornos en las últimas etapas de la enfermedad.<sup>28</sup>

Mutaciones en este gen se asocian a una pérdida de la actividad de la enzima dismutasa en un 50-80%, dando lugar a una hipótesis inicial en que se creía que la

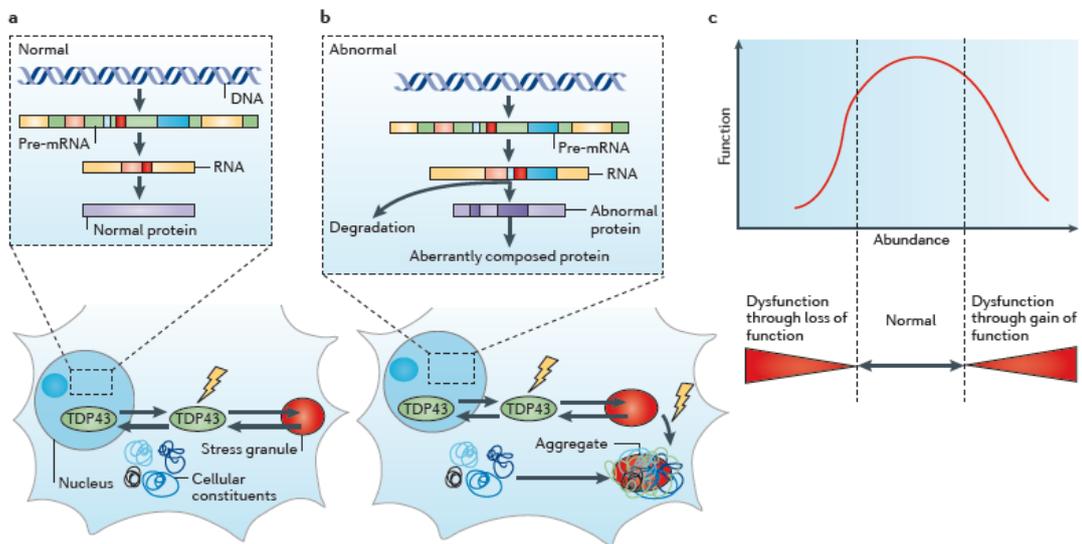
enfermedad era provocada por esta pérdida de funcionalidad. Sin embargo, estudios posteriores mostraron que la actividad dismutasa no estaba relacionada con la severidad de la enfermedad, indicando que el mecanismo que da lugar al trastorno es una ganancia de función tóxica de la proteína mediante interacción con otras. Esto incluye excitotoxicidad, disfunción mitocondrial o estrés retículo-endoplasmático.<sup>31</sup>

Bajo condiciones de estrés SOD1 (incluso wild-type) se pliega incorrectamente y tiende a formar agregados que tienen propiedades de tipo prión.<sup>32,33</sup> Ciertos estudios han demostrado que SOD1 es secretada a territorios contiguos a la célula, esparciendo la enfermedad a zonas cercanas.<sup>34,35</sup> De esta forma, es posible que este mecanismo tipo prión sea el responsable de la propagación sináptica proteínas SOD1 mal plegadas a otras estructuras del sistema nervioso.<sup>36</sup>

2. TARBDP: Gen ubicado en posición 1p36.22 que codifica para la proteína TDP-43. Se trata de una proteína altamente conservada que se expresa de forma ubicua principalmente en el núcleo, cuyas funciones son la transcripción y procesamiento de RNAs (unos 6000 RNAm), tanto de su splicing como de su transporte al citoplasma y la biogénesis de RNAs.<sup>37,6</sup> En el año 2008 se reportaron por primera vez mutaciones de este gen en casos de ELA familiar. Desde entonces se han identificado más de 40 mutaciones de este gen causantes de un 4-5% de casos de ELA familiar y un 2% de casos de ELA esporádica. Pacientes de ELA con mutaciones en el gen TARBDP muestran principalmente la forma medular de enfermedad, afectando en primer lugar a las extremidades. La edad a la que comienzan los síntomas es muy variada (30 a 77 años), así como la duración de la enfermedad.<sup>38</sup> Estas mutaciones se observan en casos de pacientes con demencia frontotemporal (DFT) y ELA-DFT. A pesar de que normalmente TDP-43 está localizada en el núcleo puede migrar al citoplasma en respuesta a situaciones de estrés (como la inanición o el estrés oxidativo), formando gránulos de estrés. De esta forma, el RNAm unido a TDP-43 es silenciado temporalmente, permitiendo a la célula priorizar la síntesis de proteínas y ejercer la respuesta adecuada al factor estresante.<sup>39</sup> Una vez cesa el estrés, los gránulos se disgregan y TDP-43 migra de nuevo al núcleo.<sup>40</sup> Se desconoce si esta función está relacionada con el mecanismo mediante el cual TDP-43 mutante causa

la ELA y cómo tiene lugar. Se cree que los gránulos de estrés constituyen un ambiente pro-agregante que da lugar a las inclusiones características de la enfermedad (Fig. 5).<sup>41</sup>

De esta forma, TDP-43 causa la patogénesis mediante un mecanismo de 2 pasos (Fig. 5). Por una parte, la salida de la proteína al citoplasma da lugar a una **pérdida de función nuclear** y, por otra, la acumulación en gránulos de estrés provoca una **ganancia de función tóxica citoplasmática**. Para tratar de discernir cuál de los dos eventos tiene mayor contribución en la patogenia de la enfermedad se han estudiado por separado ambos factores, concluyendo en que ambos contribuyen de manera muy similar a la citotoxicidad.<sup>42</sup>



**Figura 5.** Posible mecanismo de patogénesis de TDP-43 mutante. **A)** Función inalterada de TDP-43. Esta proteína es esencial para el procesamiento de RNA en el núcleo. En una situación de estrés (representada por el símbolo del rayo) abandona el núcleo y se acumula en forma de gránulos de estrés. Si el estrés cesa, TDP-43 es liberada de los gránulos y regresa al núcleo a ejercer su función. **B)** Las mutaciones favorecen la salida de TDP-43 del núcleo, así como la acumulación irreversible en gránulos de estrés. Factores de estrés adicionales pueden ser la causa de la irreversibilidad. Como resultado, el splicing del RNAm falla. Los RNAs son degradados (dando lugar a la ausencia de determinadas proteínas) o el splicing da lugar a RNAs que codifican proteínas aberrantes. Es posible que fragmentos tóxicos de RNA abandonen el núcleo y ejerzan efectos nocivos en el citoplasma. Otras proteínas (y RNAs) pueden ser secuestradas por las acumulaciones de TDP-43. **C)** La abundancia de TDP-43 en la célula está altamente regulada, pequeñas variaciones en una dirección u otra pueden dar lugar a disfunción celular.<sup>6</sup>

Por otra parte, TDP-43 une a transcritos de FUS, VCP o progranulina que codifican para proteínas asociadas a distintas enfermedades neurodegenerativas.<sup>38</sup> Además, une también al mRNA mutante de SOD1, pero no al wild-type, estableciendo así una conexión entre ambos mecanismos de patogénesis.<sup>43</sup>

3. FUS: Gen ubicado en posición 16p.11.2 que codifica para la proteína nuclear de unión a DNA/RNA FUS. Esta proteína juega un importante papel en varios procesos celulares como la regulación de la transcripción, splicing y transporte de RNA, reparación del DNA y respuesta al daño. <sup>44</sup> Pacientes de ELA provocado por mutaciones en este gen se caracterizan por presentar un amplio espectro de edades en que dan comienzo los síntomas (26 a 80 años) con una duración media de alrededor de 33 meses. La mayoría de casos muestran predominancia de degeneración de la motoneurona inferior, sin afectación en regiones bulbares ni trastornos cognitivos. Hasta el momento se conocen más de 50 mutaciones de este gen responsables de un 4% de los casos de ELA familiar y un 1% de ELA esporádica.

38

Estas mutaciones están presentes en pacientes con ELA familiar asociada a demencia frontotemporal (DFT) y en pacientes jóvenes de ELA con inclusiones basófilas. Se produce principalmente la afectación de la región C-terminal de la proteína, impidiendo su transporte al núcleo y dando lugar a la formación de gránulos citoplasmáticos. De esta forma, se produce una pérdida de función nuclear y una ganancia de función tóxica en el citoplasma. <sup>38</sup>

TDP-43 y FUS llevan a cabo el procesamiento de múltiples RNAs e interactúan físicamente a la hora de regular estos procesos. <sup>45</sup> En este contexto, se ha visto en modelos *knockdown* de TDP-43 en pez zebra que este se podría rescatar mediante la sobre-expresión de FUS. <sup>46</sup> Por otra parte, en modelos de *Drosophila melanogaster* se han visto similitudes en el perfil transcriptómico de ambas proteínas, sugiriendo la existencia de una colaboración entre ambas. <sup>47</sup>

4. C9orf72: Gen ubicado en posición 9p21.2 que codifica para la proteína C9orf72, componente del complejo C9orf72-SMCR8, que tiene función de factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF) y regulador de la autofagia. <sup>48</sup>

En el año 2011 se descubrió que la repetición del hexanucleótido GGGGCC en el gen es la causa genética más frecuente de la ELA familiar (40% de los casos) y la DFT familiar (25%) en los casos de las poblaciones europea y norte americana. Además, también se ha observado en el 7% de los casos de la ELA esporádica. Sin embargo, es extremadamente rara en Asia y Oriente Medio. La edad en la que se da la

aparición de la enfermedad es bastante variada (27 a 83 años) con duración de 1 hasta 22 años. La repetición de este hexanucleótido se ha identificado como causa de otros síndromes neurodegenerativos como Parkinson, Huntington, Alzheimer...<sup>49</sup> En el 95% de los casos los pacientes presentan  $\leq 11$  repeticiones del hexanucleótido en el gen. La cantidad de repeticiones de la secuencia que dan lugar al desarrollo de la enfermedad permanece incierta, introduciéndose alrededor de 30 en los distintos modelos animales generados hasta el momento. Pacientes con ELA asociada a DFT con repeticiones del hexanucleótido en el gen C9orf72 presentan desde 100 hasta 1000 copias del mismo.<sup>49</sup>

Las repeticiones de GGGGCC se transcriben bidireccionalmente en RNA repetitivo sentido y anti-sentido. A pesar de estar en zonas no codificantes del gen, estos RNA pueden ser traducidos y dar lugar a 5 tipos diferentes de proteínas dipeptídicas de repetición (DPRs). Se han descrito tres mecanismos patogénicos provocados por las mutaciones de C9orf72: pérdida de función de C9orf72 y ganancia de función tóxica de los RNA repetitivos y de las DPRs. Los tres mecanismos contribuyen a la patogenicidad de la enfermedad y se cree que la diferente contribución de cada uno de ellos (puede cambiar en función de la fase de la enfermedad) puede explicar la heterogeneidad clínica y patológica de los pacientes que presentan esta mutación.

49

### 1.2.2. Factores de riesgo ambientales para padecer ELA

En cuanto a los factores ambientales, estudios previos sugieren que los pacientes de ELA deben haber estado expuestos a determinados agentes tóxicos que han dado lugar, junto a otros factores, al desarrollo de la enfermedad. Uno de estos factores es el tabaco. Fumar aumenta las probabilidades de padecer ELA mediante inflamación, estrés oxidativo y neurotoxicidad provocados por los metales pesados contenidos en los cigarrillos. El riesgo es aún mayor si se comienza a fumar a edades tempranas. Se cree que fumar es el mayor factor de riesgo no genético de los descritos hasta el momento. La actividad física también parece dar lugar a una mayor probabilidad de desarrollar la enfermedad, ya que es más común en atletas. Sin embargo, ciertos estudios han dado resultados inconsistentes con esta idea, impidiendo afirmar esta correlación. Una posible explicación a esto implica perfiles genéticos. Existen determinados genes

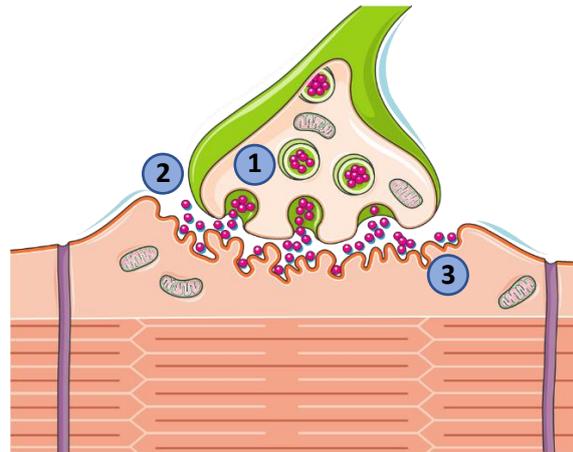
relacionados con el ejercicio que pueden dar lugar al desarrollo de la ELA. Se cree que ciertos perfiles genéticos asociados a un buen estado de forma incrementan la probabilidad de padecer la enfermedad.<sup>4</sup>

Otro factor a tener en cuenta son los agentes químicos como los utilizados en agricultura. Muchos pesticidas son neurotóxicos y sustancias como los organofosfatos tienen efecto directo en la sinapsis de las motoneuronas inferiores. Por ello, trabajadores de campo o atletas que practican sobre hierba tienen una mayor probabilidad de padecer ELA. Otro factor a tener en cuenta son los metales, como el plomo. Se sabe que son neurotóxicos y pueden causar distintas neuropatías con una fuerte afectación de las motoneuronas. Varios estudios han logrado establecer una relación ente el plomo y la ELA, mientras que otros no muestran esta correlación. En muchos de estos estudios se ha observado que pacientes con altos niveles de plomo presentan tiempos de supervivencia mayores. Por tanto, es posible que el plomo sea un factor de riesgo a la hora de desarrollar la enfermedad, pero actúe como factor protector en la progresión de la misma. Otros metales como el selenio o el mercurio han sido menos estudiados y todavía no se ha observado ninguna relación.<sup>27</sup>

Por último, la dieta también puede influir en la aparición de la enfermedad. El consumo de una alta cantidad de glutamato o grasas parecen tener efectos adversos en pacientes con ELA, mientras que los ácidos grasos omega 3, la vitamina E y las fibras pueden presentar una función defensiva. Una sobre-estimulación de los receptores de glutamato da lugar a un aumento de los niveles de calcio intracelulares, lo que puede provocar una muerte neuronal selectiva similar a la que se observa en la ELA. Normalmente, el glutamato no puede cruzar la barrera hematoencefálica, por lo que se desconoce si el glutamato obtenido a partir de la dieta afecta a la neurotransmisión. En cuanto a los ácidos grasos omega 3, poseen un efecto antiinflamatorio lo cual podría reducir la inflamación provocada por la muerte neuronal. Estos ácidos grasos junto con la vitamina E han demostrado reducir el riesgo de la ELA en un 60%.<sup>4</sup>

### 1.3. Mecanismos de toxicidad autónomos y no autónomos de la motoneurona

La función contráctil del músculo esquelético está regulada por sistemas neuronales que interactúan con fibras musculares. La unión neuromuscular (UNM) es una región especializada donde tiene lugar la comunicación entre el axón final de la motoneurona y el músculo, responsable de iniciar potenciales de acción a lo largo de la superficie del mismo, dando lugar a su contracción.<sup>50</sup> Está compuesta por tres elementos principales (Fig. 6): la región presináptica que contiene el nervio terminal (motoneurona), el espacio sináptico (donde se encuentran las células de la glía) y la superficie postsináptica (músculo), conocida como placa motora.<sup>51</sup>



**Figura 6.** Representación de la unión neuromuscular. **1)** Región presináptica, **2)** Espacio sináptico, **3)** Placa motora

En la ELA se observa una afectación que tiene lugar en los 3 tipos celulares implicados en la unión neuromuscular. Dentro de los distintos tipos celulares, las células mayormente afectadas son las motoneuronas. Como se ha comentado previamente, se han descrito diversas afectaciones celulares en las mismas, conocidas como mecanismos de toxicidad autónomos. Destacan alteraciones en el procesamiento de RNA, aumento del estrés oxidativo, trastornos en el metabolismo proteico, defectos en el transporte axonal, excitotoxicidad y desórdenes sinápticos. Existen distintos factores que han permitido explicar la particular vulnerabilidad de estas células:<sup>52</sup>

- 1- Su gran tamaño y robusto citoesqueleto, lo cual requiere de una gran demanda metabólica.
- 2- La gran necesidad de una función mitocondrial óptima.
- 3- Vulnerabilidad a la excitotoxicidad y la desregulación de la homeostasis intracelular del calcio. Al ser la mitocondria un reservorio citosólico que es crítico en las neuronas, las alteraciones mitocondriales no solo comprometen las demandas metabólicas de las motoneuronas, sino que también repercuten directamente en la capacidad homeostática de calcio y fenómenos de excitotoxicidad.

- 4- Capacidad reducida de respuesta a choque térmico y actividad de las chaperonas, así como una menor actividad del sistema ubiquitin-proteasoma.

En el pasado, cuando los científicos han llevado a cabo estudios de la función neuronal, todos los eventos relacionados con el daño neuronal y la muerte celular se estudiaban desde un único punto de vista. Este punto de vista se basaba en el hecho de que las neuronas se dañaban únicamente por la disfunción y desregulación de ellas mismas, y este daño no estaba relacionado con ningún otro tipo celular. Con el paso del tiempo, esta perspectiva y el conocimiento de los mecanismos de daño neuronal han cambiado. Han surgido gran cantidad de evidencias que demuestran que células no neuronales, como astrocitos, microglía u oligodendrocitos, o incluso el propio músculo, contribuyen al daño en las motoneuronas y la muerte celular en la ELA. Estos daños producidos por otros tipos celulares se conocen como mecanismos de toxicidad no autónomos.<sup>53</sup>

A pesar del progreso en el conocimiento acerca de la patogénesis de la ELA, todavía se desconoce cuándo y dónde comienza la disfunción, así como los factores que aceleran la degeneración de las motoneuronas. Actualmente, se cree que la ELA puede producirse, por una parte, debido a la degeneración de las motoneuronas o, por otra, debido a una degeneración de la unión neuromuscular y concomitante axonopatía distal debido a los mecanismos de toxicidad no autónoma, que progresa hacia el cuerpo celular; teoría conocida como *"dying-back"*.<sup>54</sup> Estudios recientes con ratones SOD1<sup>G93A</sup> han demostrado que la degeneración de la unión neuromuscular tiene lugar de forma temprana en la progresión de la enfermedad, mucho antes que la degeneración de las motoneuronas.<sup>50</sup> Existen evidencias que sugieren que la debilidad muscular no aparece hasta que una gran proporción de motoneuronas han sido afectadas.<sup>55</sup> Sin embargo, la diferencia de tiempo entre la degeneración de la unión neuromuscular y la debilidad muscular está causada por una reinervación axonal latente del músculo. Este proceso permite compensar la denervación en el comienzo de la afectación, evitando así la pérdida de fuerza muscular. Llegado a un punto, el proceso de reinervación no es suficiente para hacer frente a la degeneración provocada por la enfermedad y la debilidad muscular se hace aparente.<sup>50</sup>

En definitiva, no hay un único mecanismo de toxicidad que afecte a las motoneuronas, existiendo, en mayor o menor grado, una contribución relativa de cada tipo celular del

sistema neuromuscular a la degeneración neuronal, incluyendo los propios mecanismos de toxicidad intrínsecos (autónomos) de la motoneurona.

#### 1.4. Tratamiento de la ELA

Existen dos fármacos aprobados para el tratamiento de la ELA: el riluzol y el edaravone. El riluzol presenta un efecto limitado pero significativo en la supervivencia del paciente, prolongándola 2 o 3 meses en el mejor de los casos. Este fármaco presenta distintos mecanismos de acción, aunque se cree que sus efectos positivos frente a la ELA son debidos a que inhibe la salida del glutamato, contrarrestando la excitotoxicidad.<sup>29</sup> Por otro lado, el edaravone se utiliza para aliviar los efectos del estrés oxidativo, manteniendo así las motoneuronas en un estado saludable preservando la función muscular.<sup>56</sup> A pesar de esto, el tratamiento estandarizado para tratar esta enfermedad es un cuidado multidisciplinario, con apoyo respiratorio y nutricional y tratamiento de los síntomas.<sup>29</sup>

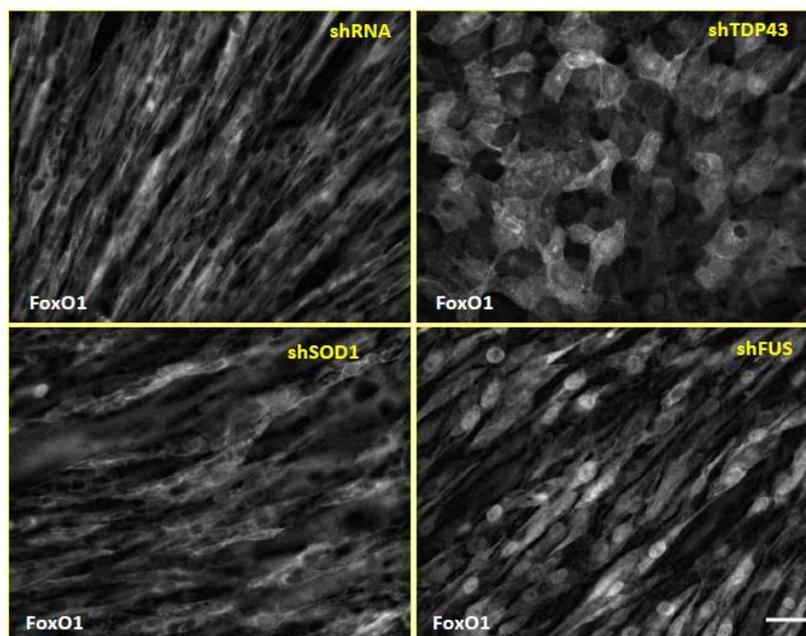
Estos fármacos únicamente permiten prolongar la esperanza de vida del paciente durante unos meses, pero no son capaces de curar la enfermedad. Es por ello que la búsqueda de un tratamiento efectivo para la ELA es prioritaria y de gran necesidad.

##### 1.4.1. FoxO como posible diana terapéutica para la ELA

Los factores de transcripción de la familia FoxO (Forkhead box protein O), constituida por FoxO1, FoxO3, FoxO4 y FoxO6, tienen una gran importancia en el control procesos celulares como el metabolismo, diferenciación celular, arresto del ciclo celular, reparación del ADN y reacciones al estrés celular.<sup>57</sup> En ausencia de insulina, en periodos de alta necesidad de energía o en presencia de estrés oxidativo estos factores se translocan al núcleo activando la expresión de genes del metabolismo de la glucosa, lípidos, y de genes relacionados con el mantenimiento de la proteostasis y disminución del estrés oxidativo.<sup>58,59</sup> En situaciones de estrés TDP-43 migra al citoplasma uniéndose a proteínas tipo chaperona 14-3-3,<sup>60</sup> provocando las traslocación de los factores de transcripción FoxO al núcleo,<sup>61</sup> dando lugar a su activación y con ello a los genes de respuesta al estrés.<sup>62</sup>

Estudios bioquímicos y de expresión genética del grupo de investigación donde se desarrolla el presente trabajo han dado lugar a la identificación de los factores de

transcripción FoxO como potenciales mediadores de los efectos tóxicos causados por la disfunción de los genes TDP-43 y FUS en modelos de mioblasto humano con silenciamiento de TDP-43 y FUS. Se ha demostrado que el factor FoxO1 se encuentra sobre-expresado de forma aberrante en el núcleo de en mioblastos humanos con deficiencia de TDP-43 o FUS, o en mioblastos derivados de pacientes con ELA (Fig. 7). Esto provoca la represión de la glucólisis y la puesta en marcha de fenómenos atróficos, induciendo eventualmente la anulación del proceso de diferenciación miogénica.



**Figura 7.** Localización de FoxO1 en las líneas de mioblastos humanos shRNA (control), sh SOD1 (silenciamiento SOD1), shTDP43 (silenciamiento de TDP-43) y sh FUS (silenciamiento FUS). Inmunofluorescencia de FoxO1 (blanco). Se observa la deslocalización nuclear en las líneas shTDP43 y shFUS.

En dicho estudio, que dio como resultado la realización de la tesis doctoral de la Dra. Mónica Zufiría y la generación de una patente, se corroboró que la inhibición preferentemente transcripcional de FoxO1 mediante el compuesto AS1842856 ejerció beneficios en los procesos de diferenciación miogénica (Fig. 8) y, además, fue capaz de corregir el fenotipo metabólico respecto a los defectos glucolíticos observados en mioblastos humanos con silenciamiento de TDP-43 o FUS (Fig. 9A) y en mioblastos de primarios derivados de pacientes (Fig. 9B). (Ref. EP20382444)

Por ello, la inhibición los factores de transcripción FoxO (especialmente FoxO 1 y FoxO3) es una potencial estrategia terapéutica para el tratamiento de enfermedades causadas por alteraciones de TDP-43 y FUS y, por ende, para el tratamiento de la ELA.

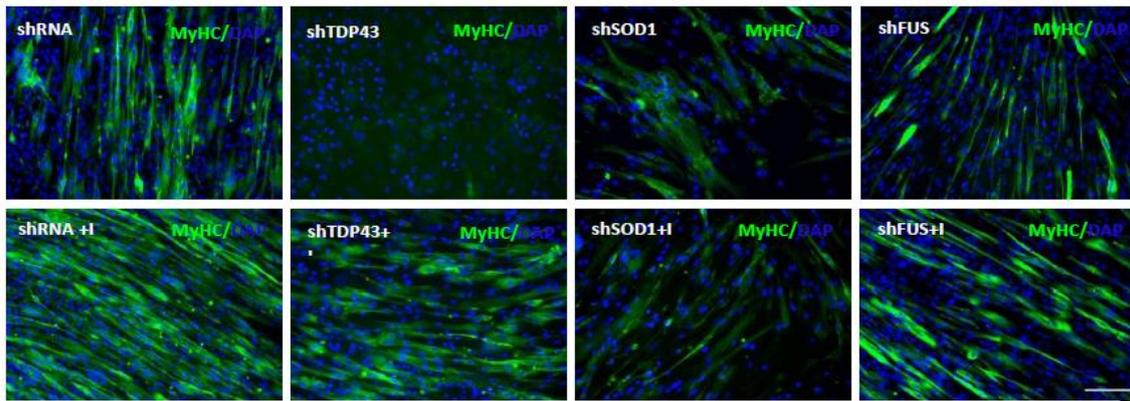


Figura 8. Efecto de la inhibición del FoxO sobre los procesos de diferenciación miogénica en mioblastos humanos con silenciamiento de SOD1, TDP-43 y FUS. Inmunofluorescencia de MyHC (verde) específica de los miofibrilos y tinción de núcleo con Dapi (azul).

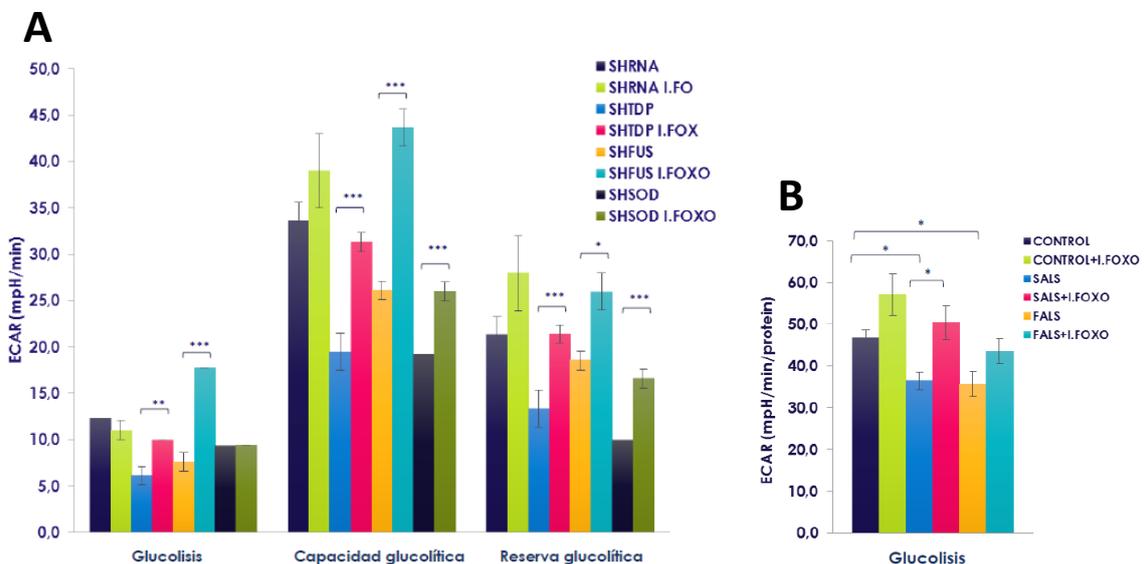


Figura 9. Efecto de la inhibición del FoxO en la capacidad glucolítica de mioblastos humanos con silenciamiento de SOD1, TDP-43 y FUS y mioblastos primarios derivados de pacientes. A) Aumento de la glucólisis en las líneas silenciadas por efecto del inhibidor de FoxO, AS1842856. Prueba t-student \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ , (n=6). B) Medida del parámetro ECAR proporcional a la actividad glucolítica en mioblastos primarios control y paciente tanto de la forma esporádica como familiar. Prueba t-Student, \* $p < 0,05$ . \*\* $p < 0,01$ . \*\*\* $p < 0,001$ , (6 réplicas).

### 1.5. *Drosophila melanogaster* como modelo *in vivo* para el estudio de la ELA

La Organización mundial de la salud considera a las enfermedades neurológicas como uno de los mayores problemas a nivel de salud pública en la actualidad. Entender su etiología, progresión o estudiar posibles diagnósticos y tratamientos requiere de un gran esfuerzo de investigación científica. Una de las formas de acelerar la investigación básica y traslacional en cuanto al conocimiento de los mecanismos patogénicos de la enfermedad, identificación de posibles rutas sobre las que actuar y agilización de los

screenings farmacológicos es la utilización de organismo de menor complejidad que el ser humano, como *Drosophila melanogaster*.<sup>63</sup>

El uso de la mosca de la fruta en la investigación comenzó hace más de 100 años y se ha convertido en una de las herramientas más útiles para nuestro entendimiento de genes, cromosomas y la transmisión de la información genética.<sup>63</sup> Las principales ventajas que muestra este modelo son las siguientes:<sup>64,65</sup>

- **Homología con el genoma humano:** alrededor del 75% de los genes relacionados con enfermedades en humanos tiene su homólogo funcional en mosca. La identidad de secuencias proteicas o nucleótidos entre homólogos de humanos y *Drosophila* es del 40%, pero se traduce en un 80-90% de homología en dominios funcionales de proteínas.
- **Almacenamiento:** Se trata de un organismo fácil y barato de almacenar en el laboratorio. Se pueden guardar gran cantidad de stocks (cada uno de los diferentes genotipos de mosca) en un único incubador, lo cual facilita la realización simultánea de experimentos.
- **Rapidez:** Un ciclo de vida de *Drosophila* toma alrededor de 10 días en completarse, permitiendo un rápido progreso de la investigación, así como la generación de gran cantidad de moscas.
- **Genoma manipulable:** Prácticamente todos los genes de *Drosophila* pueden ser objetivo de modificaciones genéticas mediante distintas estrategias y herramientas.
- **Fácil visualización de estructuras biológicas:** La observación de células y tejidos del animal es relativamente sencilla. Sus órganos son de baja complejidad y tamaño y pueden ser estudiados en vivo o por fijación directa y protocolos de tinción. Además, la realización de estos experimentos no está sujeta a requerimientos legales.
- **Genoma poco redundante:** Únicamente uno o pocos genes de la mosca codifican para proteínas de la misma clase, siendo más sencillo realizar estudios de pérdida de función. En organismos complejos la presencia de genes que codifican para proteínas de función similar dificulta estos ensayos.

- **Bases de datos:** Más de 100 años de utilización de este modelo animal ha dado lugar a gran cantidad de conocimiento sobre el mismo, así como una amplia variedad de herramientas genéticas que utilizar. Es por ello por lo que existen gran cantidad de bases de datos que permiten el acceso a información de forma rápida y sencilla.

Sin embargo, a pesar de todas las ventajas que otorga este modelo y su similitud biológica con el ser humano, existen ciertas limitaciones a tener en cuenta. A la hora de estudiar procesos complejos que implican la actuación de varios factores en enfermedades humanas, el correspondiente modelo de mosca solo permite analizar ciertos aspectos de los mismos. Pueden existir factores que provoquen diferencias fisiológicas significativas que den lugar a fenotipos más simples o diferentes en el caso de *Drosophila*. Aunque estos modelos permiten obtener gran cantidad de información, tener una hipótesis bien definida y un conocimiento de las limitaciones del mismo son fundamentales.<sup>64</sup>

En el caso de la búsqueda de nuevos fármacos, es clave considerar las potenciales diferencias farmacocinéticas y farmacodinámicas que pueden dar lugar a discrepancias en la concentración y distribución del fármaco en los tejidos de la mosca en comparación con la que tendría lugar en los mamíferos. Por ejemplo, a la hora de estudiar enfermedades del sistema nervioso central, pueden existir diferencias significativas en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica. Por otra parte, pueden existir cambios en cuanto a la toxicidad del fármaco. Debido a las diferencias metabólicas, ciertos fármacos pueden ser tóxicos en mosca y en humanos no, y viceversa. A pesar de esto, parece haber una fuerte similitud en la toxicidad observada en ambas especies.<sup>64</sup>

Debido a esto, es importante destacar que *Drosophila melanogaster* puede ser utilizado únicamente como herramienta de screening con el objetivo de reducir el número de posibles fármacos a la hora de tratar una enfermedad. En caso de obtener resultados positivos en mosca, estos fármacos deben testarse en los tradicionales modelos animales mamíferos. Sin embargo, gracias a la utilización de *Drosophila melanogaster* en investigación, el tiempo necesario para identificar compuestos eficientes es mucho menor.<sup>64</sup>

### 1.5.1. Modelos de ELA en *Drosophila melanogaster*

En la actualidad se han generado una gran cantidad de modelos de ELA en este organismo (alrededor de 35) ya que la mayoría de genes de ELA están conservados y ofrece amplias facilidades a la hora de estudiar su fenotipo motor. La gran mayoría de modelos están orientados al estudio de los genes *Tbph* (homólogo de TARBDP) y *Caz* (homólogo de FUS), aunque también se han generado modelos del gen SOD1<sup>66,67</sup> y C9orf72. A pesar de que *Drosophila* carece de un ortólogo de C9orf72, se han establecido modelos de sobre-expresión que mimetizan la enfermedad en la mosca.<sup>68,69,70</sup> Además, se han realizado modelos de otros genes que afectan al metabolismo del RNA como ATXN2,<sup>71,72</sup> VCP,<sup>73</sup> SETX<sup>74</sup> y HNRNPA1.<sup>75</sup>

En cuanto a los modelos de *Tbph*, se ha visto que moscas con deficiencias en esta proteína presentan defectos en la función locomotora, afectaciones en la unión neuromuscular<sup>76,77</sup> y una disminución en las ramificaciones dendríticas de las neuronas sensoriales.<sup>78</sup> Por otra parte, estos fenotipos pueden ser revertidos mediante la sobre-expresión en motoneuronas de *Tbph* o TDP-43 humana (hTDP-43),<sup>76,77</sup> demostrando que son el resultado de una pérdida de función de *Tbph* en las motoneuronas y que las funciones de TDP-43 se conservan entre ambas especies. Por otro lado, la generación de modelos de mosca con sobre-expresión de hTDP-43 (wild-type y mutantes asociados a la ELA) permite el estudio de los efectos provocados por la ganancia de función tóxica citoplasmática de la proteína. Estos estudios han demostrado la aparición de agregados citoplasmáticos<sup>76,79,80</sup> y la agregación al *Tbph* endógeno de la mosca.<sup>81,82</sup> Destaca la aparición de un fenotipo similar al observado en los modelos con deficiencia de la proteína, presentando disfunción motora, esperanza de vida reducida, degeneración ocular dependiente de la edad y afectaciones en la unión neuromuscular con una reducción en el número de botones y ramas axonales.<sup>76,83,84</sup>

En lo respectivo a los modelos de *Caz*, moscas con deficiencias de esta proteína presentan una esperanza de vida muy reducida, así como afectaciones locomotoras.<sup>47,85</sup> La capacidad locomotora de las moscas es rescatada mediante la expresión neuronal de *Caz* y, además, el fenotipo de modelos con silenciamiento específico neuronal se asemeja al fenotipo de silenciamiento inespecífico,<sup>85</sup> demostrando que estos efectos son causa de la deficiencia neuronal de la proteína. Por otra parte, se han estudiado

modelos de sobre-expresión de *Caz* o *FUS* con mutaciones asociadas a la ELA. De forma similar a los modelos con silenciamiento de la proteína se observa un déficit locomotor, siendo más evidente en el caso de *FUS* mutante. <sup>86-89</sup>

Finalmente, en un estudio llevado a cabo por el Dr. Gorka Gereñu del departamento de neurociencias de Biodonostia, se observó en modelos de *Drosophila* con silenciamiento condicional de *Tbph* o *Caz* en músculo una afectación locomotora y una reducción en la esperanza de vida que fue recuperada mediante el tratamiento con inhibidor de FOXO AS1842856. (Ref. EP20382444)

La ELA no tiene un tratamiento efectivo que mejore la calidad de vida de los pacientes. Es preciso aportar nuevos datos y evidencias que permitan avanzar en el conocimiento del origen de la degeneración de la motoneurona, pues solo así se podrán diseñar estrategias preventivas que logren con éxito frenar o ralentizar el desarrollo de esta enfermedad tan letal. El presente trabajo está englobado en un proyecto mayor y más ambicioso dedicado a estudiar el efecto de la función defectiva de varios genes causantes de ELA (*TDP-43* y *FUS*) sobre los mecanismos de toxicidad autónoma y no autónoma de la motoneurona, tratando de disertar la contribución relativa de cada uno de los diferentes tipos celulares que componen el sistema neuromuscular en la degeneración de la motoneurona. Así pues, el presente proyecto fin de Master estudiará de forma concreta la vulnerabilidad intrínseca de la motoneurona a dichos defectos genéticos mediante la generación y caracterización de un modelo de *Drosophila* con silenciamiento específico de *Tbph* o *Caz* de forma condicionada en la motoneurona, y buscará sugerir nuevas terapias mediante la inhibición farmacológica de los factores de transcripción FOXO.

## 2. Hipótesis y objetivos

Los genes TARBDP y FUS se expresan de forma ubicua en todo el organismo y prácticamente en todos los tipos celulares, pero las mutaciones en estos genes afectan selectivamente a las motoneuronas. Dichas mutaciones generan una patología proteínopática caracterizada por la deslocalización intracelular y el consecuente vaciado nuclear de las proteínas codificadas, TDP-43 y FUS, ejerciendo con ello un mecanismo dual de toxicidad: En primer lugar, el vaciado de dichas proteína del núcleo de la célula priva a estas proteínas de velar por la correcta regulación génica nuclear; y en segundo lugar, la formación de agregados aberrantes en el citoplasma interfiere con el correcto funcionamiento de procesos y orgánulos celulares provocando así anomalías en la estasis celular. Recientemente, evidencias fragmentarias han cuestionado el origen neurogénico de la ELA en pro de destacar el papel que juegan otras células del entorno en la vulnerabilidad selectiva de la motoneurona, y en este sentido, se han observado signos de patología TDP-43 tanto en células de la glía de la médula espinal y corteza como en fibras del músculo esquelético distal en pacientes.

No cabe duda de que el estudio de la degeneración de la motoneurona y la importancia de TARBDP y FUS en el desarrollo de la ELA son un punto crítico a la hora de estudiar el origen patogénico de la enfermedad. En el presente TFM partimos de la hipótesis de que el origen patológico en células del entorno de la motoneurona tiene un papel contributivo, pero no estrictamente necesario en la degeneración de la motoneurona, siendo requisito fundamental la inducción temprana de la patología en la propia motoneurona. En base a esto especulamos que la inducción de pérdida de función de TARBDP o FUS de forma específica en motoneuronas de *Drosophila melanogaster* mediante silenciamiento condicional de los genes ortólogos (*Tbph* y *Caz*) será suficiente para remedar fenotipos de ELA. Estos son unos modelos novedosos que podrían ser utilizados como modelo *in-vivo* de ELA con la finalidad de aportar evidencias experimentales que esclarezcan el grado de contribución de la denervación y la degeneración de la motoneurona en la aparición de la enfermedad, y que podrían servir como modelo de screening para testar nuevas estrategias terapéuticas, como la inhibición de los factores de transcripción FoxO.

La hipótesis expuesta dará lugar a los siguientes objetivos concretos:

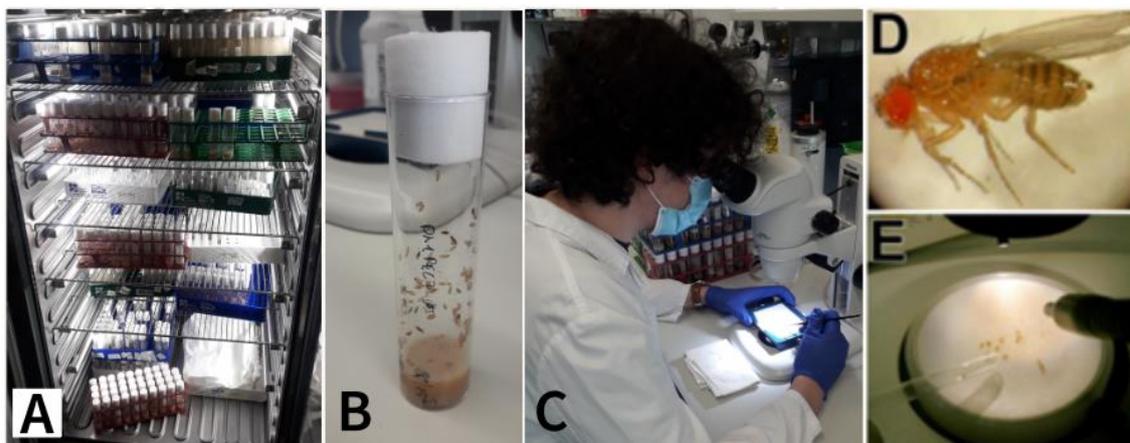
- 1- La realización de cruces de distintos genotipos de *Drosophila* que permita obtener los modelos con silenciamiento de *Tbph* o *Caz* en motoneurona.
- 2- La confirmación del silenciamiento mediante análisis de niveles de proteína *Tbph* con técnicas de inmunoblot.
- 3- La caracterización de la actividad locomotora y longevidad de los modelos generados, buscando detectar diferencias en los fenotipos de las moscas con silenciamiento de los genes causantes de la ELA.
- 4- Finalmente, el estudio del efecto del tratamiento con un inhibidor de FoxO sobre el fenotipo de los modelos.

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1. Mantenimiento del modelo de *Drosophila melanogaster*

Los distintos genotipos de *Drosophila melanogaster* (también conocida como mosca de la fruta o el vinagre) se almacenaron en tubos de plástico con comida en su base (composición: agar 6 g/l, levadura 62,5 g/l, azúcar 41,6 g/l, harina de maíz 29 g/l y ácido propiónico 4,1 ml/l) y se cubrieron con un tapón de algodón (Fig. 10B). Los tubos se depositaron en bandejas guardadas en un incubador (Fig. 10A) con las condiciones idóneas para el desarrollo de las moscas: temperatura: 23°C, humedad: 70% y ciclos de luz y oscuridad 12h/12h. Estas condiciones determinan la duración del ciclo vital de la mosca, que como referencia en moscas no transgénicas ronda los 10 días. En caso de almacenar las moscas a 18°C este tiempo se duplica.<sup>65</sup> Los tubos con comida se conservaron previamente en una cámara a 4°C, atemperándolos a temperatura ambiente en el momento de ser utilizados.

Para llevar a cabo la manipulación y manejo del animal (Fig. 10C, 10D, 10E) se utilizaron bombonas de CO<sub>2</sub> comprimido a alta presión conectadas a una bandeja de extensión donde se inmovilizan las moscas. Esta bandeja consta de poros que permiten la salida controlada del CO<sub>2</sub> ejerciendo un efecto sedante en el animal. Para la correcta visualización del modelo se utilizó una lupa estereoscópica (Nikon SMZ745T). Las moscas generadas de interés se transfirieron a nuevos tubos para su posterior utilización, mientras que las demás se desecharon.



**Figura 10. Mantenimiento y manejo de moscas en el laboratorio. A)** Incubador de almacenamiento de las moscas, **B)** Moscas contenidas en los tubos de plástico, **C-E)** Manejo del modelo de *Drosophila melanogaster*.

### 3.2. Técnica de silenciamiento en mosca

Se utilizó el sistema UAS/GAL4 como técnica de silenciamiento condicional de genes de *Drosophila melanogaster*.

Este sistema tiene dos partes: Gal4 es un gen que codifica a una proteína proveniente de levaduras que activa la transcripción de genes asociados a secuencias *enhancer* UAS. Gal4 no existe de forma endógena en las moscas y no actúa en ningún otro loci de su genoma, lo cual lo convierte en una herramienta muy útil de manipulación genética de este animal. Tras el *enhancer* UAS se encuentran las secuencias que queremos expresar, pudiendo ser de distinta naturaleza: genes reporteros, distintas isoformas de otros genes de la mosca, RNA interferentes (RNAi) para silenciar otros genes de interés...<sup>65</sup>

Con el objetivo de generar el modelo animal necesario para el proyecto se cruzaron líneas de moscas que expresan Gal4 específicamente en motoneurona con líneas que contienen secuencias UAS. En este caso, tras estas secuencias se encontraba un elemento transgénico el cual expresa un RNAi encargado de llevar a cabo el silenciamiento de los genes en estudio (ciertos genotipos silenciaban *Tbph* y otros *Caz*). Por otra parte, presentaban otra secuencia UAS tras la que se encontraba *Dicer 2* (Dcr-2), un factor que permite potenciar la transcripción del transgén, dando lugar a un silenciamiento más potente. De esta forma, la descendencia obtenida del cruce fueron las moscas experimentales utilizadas en los distintos ensayos.

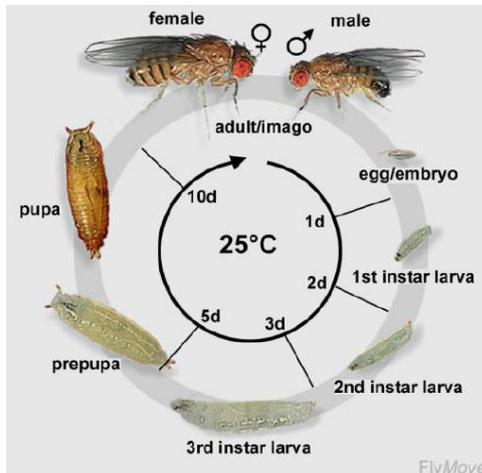
El silenciamiento llevado a cabo por el RNAi codificado en el transgén se lleva a cabo post-transcripcionalmente. Se trata de un RNAs específico dirigido a degradar el RNAm del gen a silenciar, uniéndose a él por medio de nucleótidos complementarios. Esto junto con la expresión de Gal4 tejido-específica da lugar a un silenciamiento de los genes a nivel de motoneurona.<sup>90</sup>

### 3.3. Obtención de nuevos modelos de *Drosophila melanogaster*

#### 3.3.1. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*

El ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* es de alrededor de 10 días, lo que permite llevar a cabo la generación de nuevos genotipos en un corto periodo de tiempo. La figura muestra cómo tiene lugar este ciclo a una temperatura de 25°C (Fig. 11). A esta temperatura el desarrollo embrionario toma alrededor de 21 horas. A esto le suceden

tres estadios larvarios. Durante ese periodo se alimentan de la comida presente en los tubos. A continuación, abandonan la fuente de comida y migran a las paredes del tubo, donde pasan al estado de pre-pupa y finalmente a pupa. Durante estas últimas fases, los órganos de las larvas degeneran (histólisis) y se reestructuran para dar lugar a su



forma adulta (metamorfosis). Así, pasados los 10 días las pupas eclosionan y se obtienen las moscas adultas. Tras la salida de las pupas, las moscas necesitan alrededor de 8 horas para completar su maduración sexual, facilitando la recogida de vírgenes para la experimentación.<sup>65</sup>

Figura 11. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*

### 3.3.2 Genética de *Drosophila melanogaster*<sup>65</sup>

*Drosophila melanogaster* es un organismo diploide, es decir, tiene dos series de cromosomas homólogos entre sí y dos copias de cada gen. Consta de 4 pares de cromosomas: un par de cromosomas sexuales (X/X en hembras y X/Y en machos) y tres pares autosómicos, representándose, por convenio, ambos alelos separados por una línea horizontal ( $\frac{X}{X}$ ) y los cromosomas separados por un punto y coma (;).

La genética de este animal se rige según las leyes de Mendel (Genética Mendeliana). De acuerdo a la primera ley (ley de segregación) una copia de cada gen es heredada de cada progenitor, separándose ambas copias durante la meiosis y transmitiéndose únicamente una de ellas a la descendencia. Por otra parte, atendiendo a la segunda ley de Mendel (ley de transmisión independiente de caracteres) la transmisión de los cromosomas no-homólogos se produce de forma independiente, dando lugar a gran cantidad de posibles genotipos resultantes. Es por ello que, generalmente, se establece un criterio de selección para cada cromosoma. Sin embargo, el cuarto cromosoma se considera vestigial por su escasez en el número de genes. Por ello, en este estudio no ha sido modificado

Los genes localizados en el mismo cromosoma son considerados como grupo de unión que tiende a segregarse conjuntamente durante la meiosis. Sin embargo, cuando los

cromosomas homólogos se unen físicamente durante la profase meiótica (sinapsis) puede ocurrir una recombinación de su material genético (*crossing over*). La frecuencia de recombinación es mayor en función de la distancia entre dos loci de genes, aunque también varía en función de la posición en que se encuentren el cromosoma (mayor frecuencia de recombinación en zonas intermedias del cromosoma y menor en regiones cercanas a telómeros y centrómero).

Cabe destacar que la recombinación homóloga no ocurre en el caso de los machos de *Drosophila melanogaster* por razones actualmente desconocidas. Sin embargo, este fenómeno afecta a las hembras y puede dificultar en gran medida el planteamiento y realización de los cruces, ya que es algo que se da de forma aleatoria, por lo que en este estudio se han utilizado lo que se conoce como cromosomas balanceadores.

Este tipo de cromosomas permiten llevar a cabo el correcto seguimiento de los cruces. Se segregan con normalidad durante la meiosis, pero impiden el proceso de recombinación con otros cromosomas, ya que cualquier producto de recombinación generado es letal debido a la duplicación y delección de fragmentos cromosómicos. Por otra parte, la mayoría de cromosomas balanceadores son letales en homocigosis. Estos cromosomas se caracterizan por la presencia de marcadores fenotípicos. Entre otras son características fenotípicas forma de las alas y pupas, largura del pelo.

En este estudio fueron utilizados los siguientes cromosomas balanceadores:

- Cyo: Curly derivative of Oster. Cromosoma 2 asociado al marcador Curly (Cy).
- SM6a: 2nd multiply-inverted 6a. Cromosoma 2 asociado al marcador Sternopleural (Sp).
- TM3: 3rd multiply-inverted 3. Cromosoma 3 asociado al marcador Stubble (Sb).
- TM6B: 3rd multiply-inverted 6B. Cromosoma 3 asociado al marcador Tubby (Tb).

### 3.3.3. Diseño de cruces

Con el objetivo de generar las moscas con los genotipos deseados se diseñaron y realizaron una serie de cruces que permitió obtenerlos y, además, llevar a cabo una asociación genotipo-fenotipo entre rasgos presentes en las moscas y su contenido genético, evitando así tener que realizar pruebas moleculares (inviabiles debido a la gran

cantidad de genotipos generados) para comprobar el resultado de cada uno de estos cruces. Para realizarlos se deben tener en cuenta ciertos puntos:

- En primer lugar, es necesario seleccionar hembras y machos de los distintos genotipos que vamos a utilizar. Generalmente, los machos son de menor tamaño que las hembras, sin embargo, esto no se cumple en todos los casos. Así, en caso de necesitar diferenciar el género de la mosca de forma inequívoca se atiende a ciertos rasgos característicos de ella (Fig. 12). El primero de ellos se trata de la presencia de pequeñas crestas en las patas delanteras de las moscas únicamente en el caso de los machos. Por otra parte, el dorso de las hembras es más claro y a rayas y en el caso de los machos la parte caudal es más oscura (aunque en caso de ser una mosca recién nacida no se observa con claridad). Finalmente, los machos poseen un aro negro alrededor del ano.<sup>65</sup>

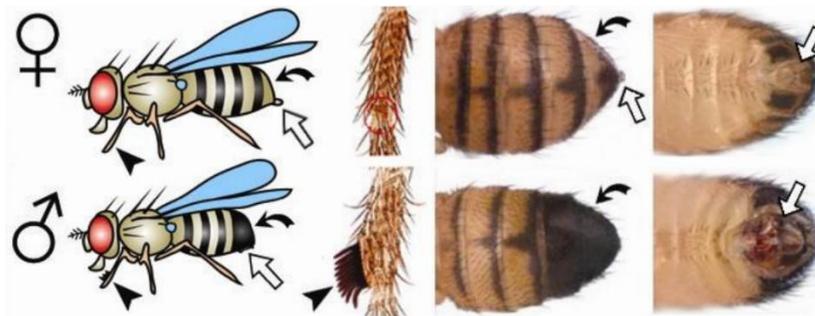
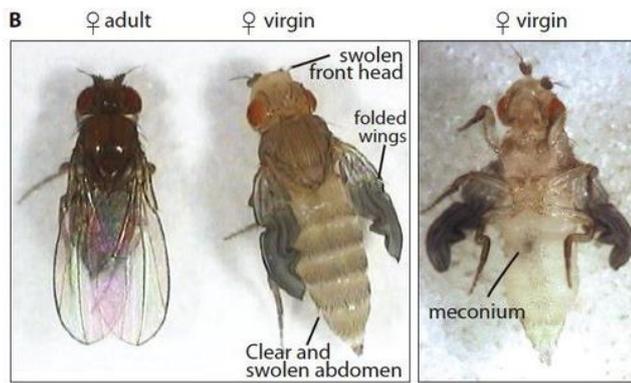


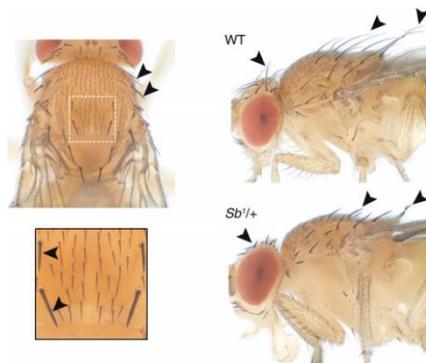
Figura 12. Criterios para la selección de género de *Drosophila melanogaster*

- En segundo lugar, las hembras utilizadas en los cruces deben ser vírgenes, permitiendo así controlar el genotipo de la descendencia resultante de los mismos. Para ello, debemos recolectar estas moscas previo a que alcancen su madurez sexual (máximo de 8 horas tras su eclosión). Las moscas vírgenes presentan ciertos rasgos característicos (Fig. 13). Durante un corto periodo de tiempo presentan las alas replegadas y, por otra parte, se puede apreciar una mancha oscura en el abdomen, que se trata del meconio y se puede utilizar como indicativo seguro de la virginidad del animal.<sup>91</sup>

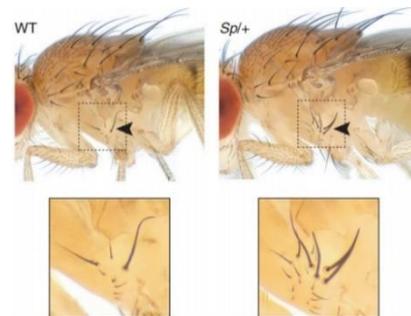


**Figura 13.** Criterios para la selección de moscas vírgenes de *Drosophila melanogaster*.

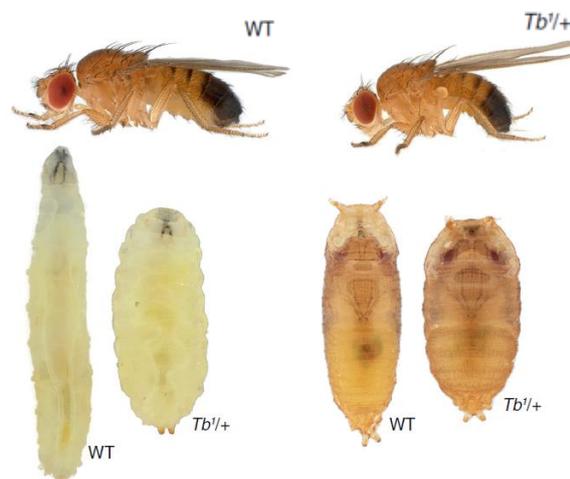
- En tercer lugar, la selección de las moscas es realizada según marcadores fenotípicos. Por ello, a la hora de diseñar un cruce se debe tener en cuenta las posibles combinaciones de marcadores obtenidas en la descendencia para así poder elegir únicamente el genotipo de interés. En este trabajo fueron empleados los marcadores: Stubble, Sb (Fig. 14); Sternopleural, Sp (Fig. 15); Tubby, Tb (Fig. 16); y Curly, Cy (Fig. 17).<sup>92-94</sup>



**Figura 14.** Marcador Stubble (Sb) de *Drosophila melanogaster*



**Figura 15.** Marcador Sternopleural (Sp) de *Drosophila melanogaster*



**Figura 16.** Marcador Tubby (Tb) de *Drosophila melanogaster*



**Figura 17.** Marcador Curly (Cy) de *Drosophila melanogaster*

A la hora de realizar los cruces se utilizaron un mayor número de hembras que de machos. En general, cada cruce constaba de 9 a 12 moscas hembras vírgenes y 3 o 4 machos, dependiendo de la disponibilidad de moscas en el momento de realizarlo. Las moscas se depositaron en los tubos y, pasado un tiempo, tras la aparición de larvas en el mismo, se traspasaron a otro anotando el día en que fue retirado. Este proceso se realizó alrededor de 3 o 4 veces por cada cruce, generando así tubos con larvas de moscas que debían ser seleccionadas para obtener el genotipo esperado del mismo.

Para llevar a cabo la selección, primeramente, se observó si las moscas presentaban el marcador Tubby (Tb) o no, ya que se puede apreciar en el estadio de pupa. Las pupas de interés (Tubby o no) se trasvasaron a nuevos tubos, anotando la fecha en ellos. En ambos tipos de tubos (tubos sobre los que se llevaba a cabo la selección y tubos seleccionados) se anotaba la fecha en que se produjo el primer nacimiento y se utilizaron únicamente los 9 días posteriores, tras esto eran desechados. De esta forma se evita la aparición de moscas de 2ª generación que pudieran tener genotipos no previstos, ya que un ciclo de vida completo toma como mínimo 10 días en completarse.

Tras el nacimiento de las moscas seleccionadas, se llevó a cabo una nueva selección en función de la presencia o no de los otros tres marcadores: Stubble (Sb), Sternopleural (Sp) y Curly (Cy). Estos marcadores podían estar presentes o no en función del cruce (no todos los cruces implicaban a los 4 marcadores) y del genotipo resultante del mismo. Así, se tomaron las moscas que presentaban los marcadores esperados. Por una parte, se seleccionaron machos y, por otra, hembras vírgenes, de forma que pudieran ser utilizadas para hacer un nuevo cruce o para generar un nuevo stock del modelo animal.

#### 3.3.4 Genotipos utilizados en la realización de los cruces

Los distintos genotipos del modelo animal se han obtenido a partir de cruces de ciertos stocks iniciales, los cuales se encargaron al “Bloomington *Drosophila* Stock Center” de la

Universidad de Indiana y al “Stock Center” de Viena, centros público de stocks de *Drosophila melanogaster*.

Los genotipos utilizados fueron los siguientes:

- 5905: Genotipo wild-type,  $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{+}{+} ; \frac{+}{+}$ .
- 9356: Genotipo con 4 marcadores,  $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{Sp}{CyO} ; \frac{Sb}{Tb}$ .
- D42 (8816): Genotipo con expresión de GAL4 en motoneurona,  $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{+}{+} ; \frac{D42-Gal4}{D42-Gal4}$ .
- OK6 (64199): Genotipo con expresión de GAL4 en motoneurona,  $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{OK6-Gal4}{OK6-Gal4} ; \frac{+}{+}$ .
- 24650: Genotipo con Dicer-2 (Dcr-2) en el cromosoma 2,  $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{UAS-Dcr2}{UAS-Dcr2} ; \frac{+}{+}$ .
- 24651: Genotipo con Dcr-2 en el cromosoma 3,  $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{+}{+} ; \frac{UAS-Dcr2}{UAS-Dcr2}$ .
- 100291: Genotipo silenciamiento *Caz*,  $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{UAS-Caz\ iRNA}{UAS-Caz\ iRNA} ; \frac{+}{+}$ .
- 39014: Genotipo silenciamiento *Tbph*,  $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{UAS-TBPHB\ iRNA}{CyO} ; \frac{+}{+}$ .
- 104401: Genotipo silenciamiento *Tbph*,  $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{UAS-TBPH401\ iRNA}{UAS-TBPH401\ iRNA} ; \frac{+}{+}$  (Stock center de Viena).

El silenciamiento llevado a cabo en los genotipos 39014 y 104401 afecta a distintos locus del gen y, además, la estrategia de silenciamiento es diferente, pudiendo dar lugar a diferencias en la eficiencia del mismo. Así, los efectos observados pueden cambiar según el stock que hayamos utilizado.

### 3.4. Ensayo de longevidad

Con la finalidad de estudiar la longevidad de las distintas líneas generadas de *Drosophila melanogaster* se tomaron alrededor de 50 moscas hembras de cada genotipo divididas en tubos de cinco individuos, tanto con tratamiento (inhibidor de FoxO 30 µM) como sin él, dando un total de alrededor de 800 moscas y 160 tubos. Se almacenaron en un incubador en las condiciones previamente mencionadas. Cada 7 días las moscas eran

transferidas a nuevos tubos y cada 2 se anotaba el número de moscas muertas en cada tubo (en caso de haberlas) así como la fecha. El porcentaje de moscas vivas se representó frente a la edad de las mismas. Las diferencias entre grupos se analizaron en Graph Pad Prism 8 mediante un análisis Mantel-Cox.

### 3.5 Ensayo de actividad locomotora

El análisis de la capacidad locomotora se llevó a cabo mediante un ensayo de escalada. Se realizó la prueba sobre cada uno de los 160 tubos de moscas dispuestos para el análisis de longevidad. Las moscas contenidas en cada tubo se analizaron cada 5 días hasta un máximo de 30 días de edad. En cada prueba las moscas se transfirieron a un tubo de mayor altura con una marca a 8 cm de la base. Tras un breve reposo, el tubo se golpeó sobre una superficie provocando la caída de las moscas al fondo del mismo. Se anotó el número de moscas que atraviesan la marca de 8 cm pasados 10 segundos. Se realizaron 3 repeticiones del proceso con pausas de alrededor de 1 minuto entre ellas. El resultado de esta prueba se registró utilizando un sistema de grabación habitual. El porcentaje de moscas capaces de atravesar la marca se representó frente a la edad de las mismas. El análisis de los resultados se llevó a cabo mediante los análisis t-student (sin tratamiento) y Anova 2-way (con tratamiento) en Graph Pad Prism 8.

### 3.6. Extracción proteica

Se llevó a cabo una extracción de muestras de tórax de los modelos de *Drosophila* generados. Para ello, las moscas se anestesiaron y mediante el uso de dos pinzas se extrajo la cabeza junto con la médula. El abdomen y alas se retiraron del cuerpo restante del animal, almacenando el tórax en un eppendorf a -20°C. Se tomaron 15 muestras de tórax de cada uno de los genotipos generados.

Una vez recogidas todas las muestras, se descongelaron y se realizó una disgregación mecánica de las mismas en el buffer de lisis mediante el Pellet Pestle Motor (Kontes). Previo a ello las muestras de tórax fueron resuspendidas en 100 µL de buffer de lisis con inhibidores de fosfatasa y proteasas (Halt™ Protease & Phosphatase inhibitor Single-Use Cocktail 100x - Thermo Scientific). Tras la disgregación se centrifugaron y se tomó el sobrenadante.

### 3.7. Western Blot

Se realizó la técnica de Western Blot con el objetivo de confirmar el silenciamiento de *Tbph* en los modelos de mosca. Las muestras se prepararon a partir de las extracciones proteicas de tórax obtenidas previamente. La determinación de la cantidad total de proteína en cada muestra se llevó a cabo mediante el kit BCA (ThermoFisher), lo cual garantiza cargar cantidades equitativas de proteína total en cada pocillo del gel de electroforesis. Se tomaron 40 µg de proteínas totales, además de LB 5X (realizado en el laboratorio, para 50 mL: 5mL Tris-Cl, 12 mL glicerol, 4 g SDS, 1,55 g DTT, 10 mg Coomassie Blue R250, H<sub>2</sub>O hasta 50 mL) reducido a 4X tras la adición de β-mercaptoetanol y, en ciertas muestras, buffer de lisis con proteasas (Halt™ Protease & Phosphatase inhibitor Single-Use Cocktail 100x - Thermo Scientific) para igualar los volúmenes. Se utilizaron geles de tricina de stacking 4% (13% acrilamida/biscarilamida, 25% gelbuffert y 62% H<sub>2</sub>O) y 10% (30% acrilamida/biscarilamida, 30% gelbuffert, 18% glicerol y 22% H<sub>2</sub>O) preparados en el laboratorio.

Se llevó a cabo la electroforesis introduciendo las muestras en los geles de tricina junto con anode buffer 1X (10X: 242 g Tris, H<sub>2</sub>O hasta 1 L de volumen final, pH=8,8) en el exterior y catode buffer 1X (10X: 121,1 g Tris, 179,2 g Tricina, 50 mL SDS 20%, H<sub>2</sub>O hasta 1 L de volumen final, pH=8,8) en el interior durante 20 minutos a 50 V constantes hasta alcanzar el final del gel de stacking y, posteriormente, alrededor de 1 hora y 15 minutos a 120 V constantes. La transferencia se llevó a cabo en una membrana de nitrocelulosa durante 1 hora y 30 minutos a 350 mA constantes sumergida en transfer buffer 1X (10X: 18,9 g Tris, 90,1 g glicina y H<sub>2</sub>O hasta 1 L de volumen final). Como control de carga se utilizó el kit total protein staining. Las membranas se bloquearon con BSA 5% (2,5g de BSA (Sigma Aldrich - Ref:1002998989), 50 mL TBST y 100 µL de NAN<sub>3</sub>) durante 45 minutos. Se incubó con el anticuerpo primario *Tbph*-Rabbit generado y validado "in-house" a concentración 1:1000 diluido en BSA 5% durante 2 días a 4°C. Como anticuerpo secundario fluorescente α-Rabbit 647 nm a concentración 1:5000 diluido en BSA 5%. El revelado de las membranas se llevó a cabo en el dispositivo iBright FL 1000. La señal de fluorescencia de las bandas específicas de cada anticuerpo se normalizó con la señal de proteína total obtenido mediante el kit Total Protein Staining.

## 4. Resultados

### 4.1. Obtención de modelos con silenciamiento de *Tbph* y *Caz* en motoneurona

La generación de los modelos de mosca con silenciamiento condicional en motoneurona de bien *Tbph* o *Caz* se llevó a cabo mediante el sistema UAS-Gal4, lo cual requirió de una serie de cruces previamente planeados. El objetivo de este planteamiento fue, mediante la asociación de genes balanceadores con marcadores fenotípicos, seleccionar los genotipos de interés en cada uno de los cruces. Esta selección se realiza basándonos en la genética mendeliana. Los primeros cruces están diseñados para generar moscas con alelos reconocibles y balanceadores genéticos mediante los marcadores fenotípicos, para posteriormente, asegurar que el modelo de mosca experimental exprese la secuencia *enhancer* UAS junto al RNAi específico de los genes que se quieren silenciar en motoneurona. Para llevar a cabo el silenciamiento condicional en motoneurona, la expresión de Gal4 se limitó al control ejercido por los promotores de OK6 o D42, los cuales son genes expresados exclusivamente en motoneurona.

#### 4.1.1 Generación del modelo OK6/Dcr-2

El objetivo de estos cruces es generar un genotipo que presente Dcr-2 en el cromosoma 3 y el promotor de OK6 en el cromosoma 2, además de los marcadores fenotípicos y cromosomas balanceadores Cyo y TM6 Tb ( $\frac{w_{1118}}{w_{1118}}$  ;  $\frac{OK6-Gal4}{Cyo}$  ;  $\frac{UAS-Dcr2}{Tb}$ ). De esta forma, cruzando este genotipo con moscas que presenten las secuencias UAS ligadas a un transgén que expresa el RNAi que actúa sobre el RNAm de los genes que queremos silenciar, se puede obtener el modelo de mosca con silenciamiento en motoneurona.

Con este propósito, el primer cruce se realizó con moscas de genotipo OK6 (64199) y moscas 9356 (que presentan los 4 marcadores). Una vez las larvas alcanzaron el estadio de pupa en los distintos tubos obtenidos, se seleccionaron aquellas que eran Tubby (Tb). Tras el nacimiento de las moscas, se tomaron aquellas que presentaban el marcador fenotípico Curly (Cy) y se desecharon las que no cumplían estas condiciones (Fig. 18). De esta forma, se obtuvo una mosca portadora de OK6, que produce la expresión de Gal4 en motoneurona, y los marcadores fenotípicos Cy y Tb, los cuales permitieron llevar a cabo posteriores selecciones. Además, Cyo y TM6 Tb se tratan de cromosomas balanceadores, evitando la recombinación en los cromosomas 2 y 3 en posteriores

cruces, y asegurando la transmisión de los genes de interés a la siguiente generación. Por otra parte, debido a que los cromosomas balanceadores en homocigosis resultan letales, se reducen el número de genotipos viables en la siguiente generación, facilitando la selección.

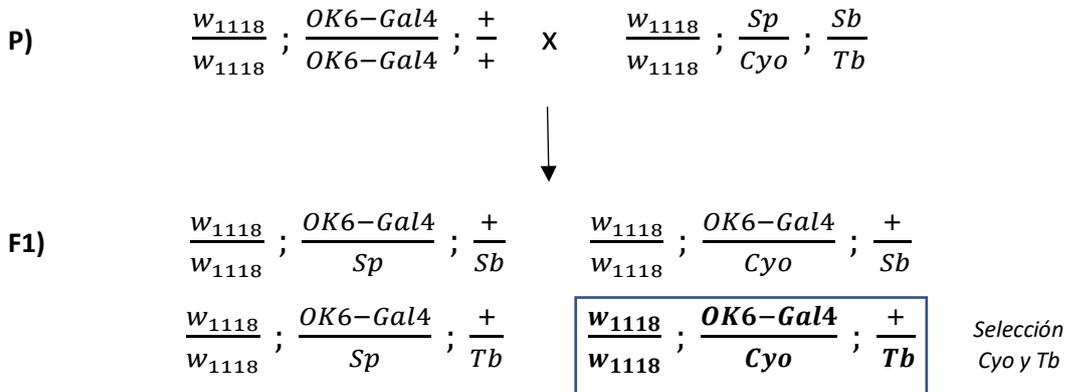


Figura 18. Esquema de cruce de moscas OK6 y 9356

El siguiente cruce se realizó con moscas de genotipo 9356 y las moscas obtenidas en el cruce explicado anteriormente ( $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{OK6-Gal4}{Cyo} ; \frac{+}{Tb}$ ). En este caso, se seleccionaron las moscas con los marcadores Tb, Cy y Stubble (Sb) y que no presentaban el marcador Sternopleural (Sp), siguiendo los criterios anteriormente mencionadas (Fig. 19).

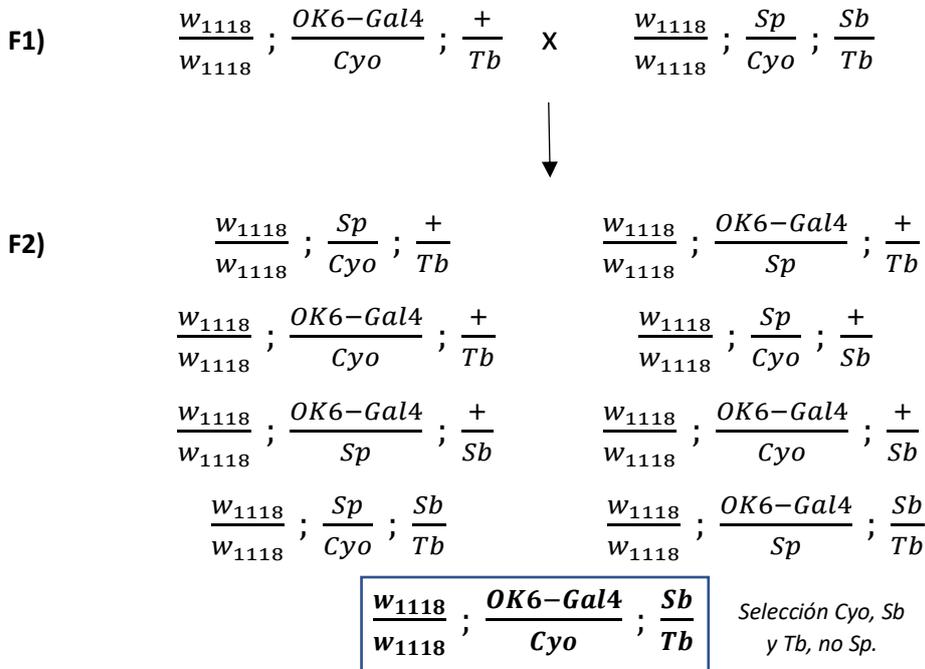


Figura 19. Esquema de cruce de moscas ( $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{UAS-OK6}{Cyo} ; \frac{+}{Tb}$ ) y 9356. Posibles genotipos resultantes con Cyo o TM6 Tb en homocigosis han sido omitidos debido a la letalidad asociada a los mismos.

De esta forma, se obtuvo un genotipo OK6-Gal4 en el cromosoma 2 que es transmisible de generación en generación, debido a la letalidad de los cromosomas balanceadores en homocigosis. Sin embargo, OK6 en homocigosis no es letal, por lo que, por simple genética de poblaciones, el cromosoma balanceador Cyo puede ir desapareciendo con el tiempo, resultando en un genotipo  $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{OK6-Gal4}{OK6-Gal4} ; \frac{Sb}{Tb}$ . Esto no supone ningún problema para posteriores cruces; es más, resulta de utilidad ya que asegura la transmisión de OK6 a las sucesivas generaciones sin necesidad de hacer una selección.

Paralelamente a estos cruces, se llevaron a cabo los relacionados con el genotipo 24651 (Dcr-2 en el cromosoma 3). En primer lugar, se cruzaron moscas 24651 y 9356. Se seleccionaron las moscas Cy y Tb (Fig. 20).

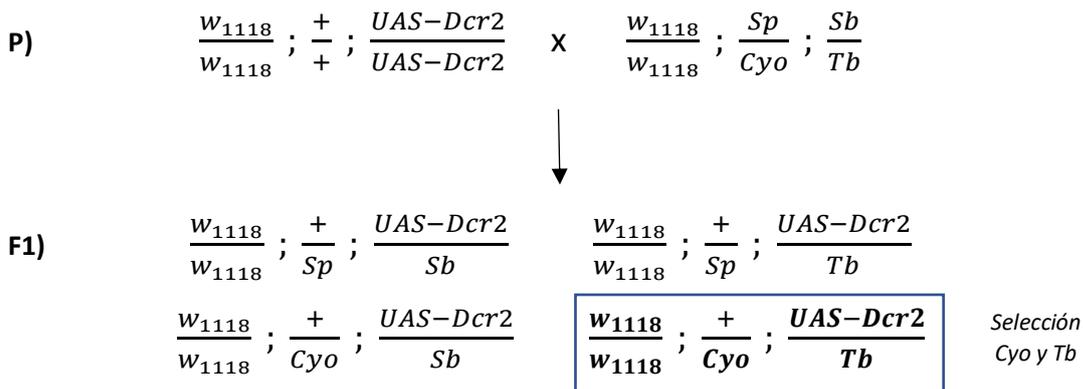
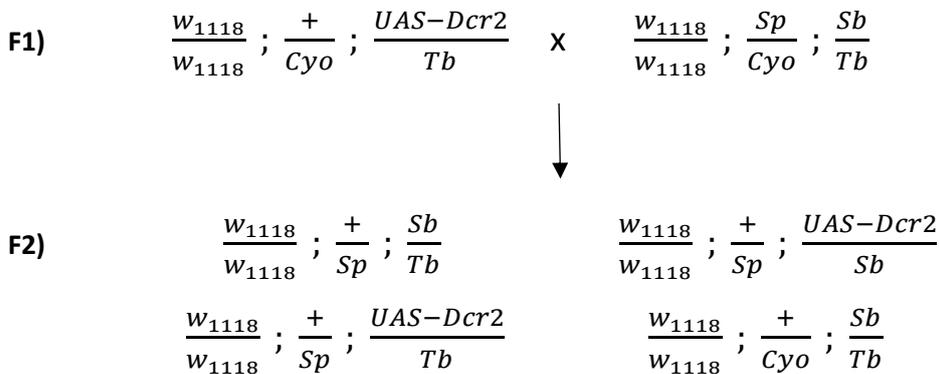


Figura 20. Esquema de cruce de moscas 24651 y 9356.

Una vez realizado este cruce, se tomaron moscas del genotipo  $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{+}{Cyo} ; \frac{UAS-Dcr2}{Tb}$  y se cruzaron de nuevo con moscas 9356. Se seleccionaron las moscas con los marcadores Tb, Cy y Sp y que no presentasen el marcador Sb (Fig. 21).



$$\begin{array}{cc}
\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{+}{Cy o} ; \frac{UAS-Dcr2}{Sb} & \frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{+}{Cy o} ; \frac{UAS-Dcr2}{Tb} \\
\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{Sp}{Cy o} ; \frac{Sb}{Tb} & \frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{Sp}{Cy o} ; \frac{UAS-Dcr2}{Sb} \\
\boxed{\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{Sp}{Cy o} ; \frac{UAS-Dcr2}{Tb}} & \text{Selección } Cy o, Sp \\
& \text{y } Tb, \text{ no } Sb.
\end{array}$$

**Figura 21.** Esquema de cruce de moscas ( $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{+}{Cy o} ; \frac{UAS-Dcr2}{Tb}$ ) y 9356. Posibles genotipos resultantes con Cy o o TM6 Tb en homocigosis han sido omitidos debido a la letalidad asociada a los mismos.

De esta forma, se obtuvieron moscas con UAS-Dcr2 en el cromosoma 3 transmisible de generación a generación. De forma similar al caso anterior, el cromosoma balanceador Cy o puede ir desapareciendo, resultando en un genotipo  $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{Sp}{Cy o} ; \frac{UAS-Dcr2}{UAS-Dcr2}$ , lo cual asegura la transmisión de Dcr2 a futuras generaciones.

Finalmente, se cruzaron entre sí moscas de los dos genotipos que fueron obtenidos previamente ( $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{OK6-Gal4}{Cy o} ; \frac{Sb}{Tb}$  y  $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{Sp}{Cy o} ; \frac{UAS-Dcr2}{Tb}$ ). En este caso, se seleccionaron moscas Tb y Cy que no presentasen Sp ni Sb (Fig. 22). Así se obtuvo finalmente el modelo de mosca con genotipo Dcr-2 en el cromosoma 3 y OK6 en el cromosoma 2 transmisible de generación en generación, que presenta además los cromosomas balanceadores Cy o y TM6 Tb ( $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{OK6-Gal4}{Cy o} ; \frac{UAS-Dcr2}{Tb}$ ).

$$\begin{array}{l}
\text{P)} \quad \frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{OK6}{Cy o} ; \frac{Sb}{Tb} \quad \times \quad \frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{Sp}{Cy o} ; \frac{DCR2}{Tb} \\
\downarrow \\
\text{F1)} \quad \begin{array}{cc}
\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{Sp}{Cy o} ; \frac{Sb}{Tb} & \frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{Sp}{Cy o} ; \frac{UAS-Dcr2}{Sb} \\
\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{Sp}{Cy o} ; \frac{UAS-Dcr2}{Tb} & \frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{OK6-Gal4}{Sp} ; \frac{Sb}{Tb} \\
\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{OK6-Gal4}{Sp} ; \frac{UAS-Dcr2}{Sb} & \frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{OK6-Gal4}{Sp} ; \frac{UAS-Dcr2}{Tb} \\
\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{OK6-Gal4}{Cy o} ; \frac{Sb}{Tb} & \frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{OK6-Gal4}{Cy o} ; \frac{UAS-Dcr2}{Sb}
\end{array}
\end{array}$$

$$\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{OK6-Gal4}{Cyo} ; \frac{UAS-Dcr2}{Tb}$$

Selección *Cyo* y *Tb*,  
no *Sb* ni *Sp*.

**Figura 22.** Esquema de cruce de moscas  $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{UAS-OK6}{Cyo} ; \frac{Sb}{Tb}$  y  $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{Sp}{Cyo} ; \frac{UAS-Dcr2}{Tb}$ . Posibles genotipos resultantes con *Cyo* o *TM6 Tb* en homocigosis han sido omitidos debido a la letalidad asociada a los mismos.

#### 4.1.2. Generación del modelo D42/Dcr-2

El objetivo de este cruce es generar un genotipo que presente *Dcr-2* en el cromosoma 2 y el promotor de *D42* en el cromosoma 3, además de los marcadores fenotípicos y cromosomas balanceadores *Cyo* y *TM6 Tb* ( $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{UAS-Dcr2}{Cyo} ; \frac{D42-Gal4}{Tb}$ ). De forma similar al modelo de *OK6*, el cruce de este genotipo con otros que posean secuencias *UAS* asociadas a un transgén que exprese los RNAs de interés da lugar al silenciamiento específico de *Tbph* y *Caz* en motoneurona.

En este caso los genotipos utilizados para la generación del nuevo modelo fueron 24650 ( $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{UAS-Dcr2}{UAS-Dcr2} ; \frac{+}{+}$ ) y D42 (8816,  $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{+}{+} ; \frac{D42-Gal4}{D42-Gal4}$ ). El proceso llevado a cabo fue semejante al del cruce explicado con anterioridad ya que son análogos, con la única diferencia de que en este caso *DCR2* se encuentra en el cromosoma 2 y el reportero de motoneurona en el cromosoma 3. Así, ambos genotipos iniciales fueron cruzados con moscas 9356 ( $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{Sp}{Cyo} ; \frac{Sb}{Tb}$ ) y seleccionados con el fin de obtener moscas  $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{UAS-Dcr2}{Cyo} ; \frac{+}{Tb}$  y  $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{+}{Cyo} ; \frac{D42-Gal4}{Tb}$ . De nuevo, se cruzaron con moscas 9356 y se seleccionaron para obtener los genotipos  $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{UAS-Dcr2}{Cyo} ; \frac{Sb}{Tb}$  y  $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{Sp}{Cyo} ; \frac{D42-Gal4}{Tb}$ , ambos transmisibles de generación en generación.

En última instancia, los nuevos genotipos obtenidos fueron cruzados entre sí y, tras el proceso de selección, se obtuvo el genotipo final:  $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{UAS-Dcr2}{Cyo} ; \frac{D42-Gal4}{Tb}$ .

#### 4.1.3. Generación de moscas experimentales con silenciamiento en motoneurona

Tras obtener los genotipos  $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{OK6-Gal4}{Cyo} ; \frac{UAS-Dcr2}{Tb}$  y  $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{UAS-Dcr2}{Cyo} ; \frac{D42-Gal4}{Tb}$  se procedió a generar el modelo final que presenta el silenciamiento de *Tbph* o *Caz*. Para ello, se cruzaron ambos genotipos con moscas que poseen secuencias *UAS* seguidas de transgenes que expresan los RNAs de los genes *Tbph* o *Caz*. Fueron utilizados los

genotipos: 100291 ( $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{UAS-Caz\ iRNA}{UAS-Caz\ iRNA} ; \frac{+}{+}$ ), 39014 ( $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{UAS-TBPHB\ iRNA}{Cyo} ; \frac{+}{+}$ ) y 104401 ( $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{UAS-TBPH401\ iRNA}{UAS-TBPH401\ iRNA} ; \frac{+}{+}$ ). En este caso se seleccionaron moscas que no presentasen ninguno de los dos marcadores (Fig. 23 y 24).

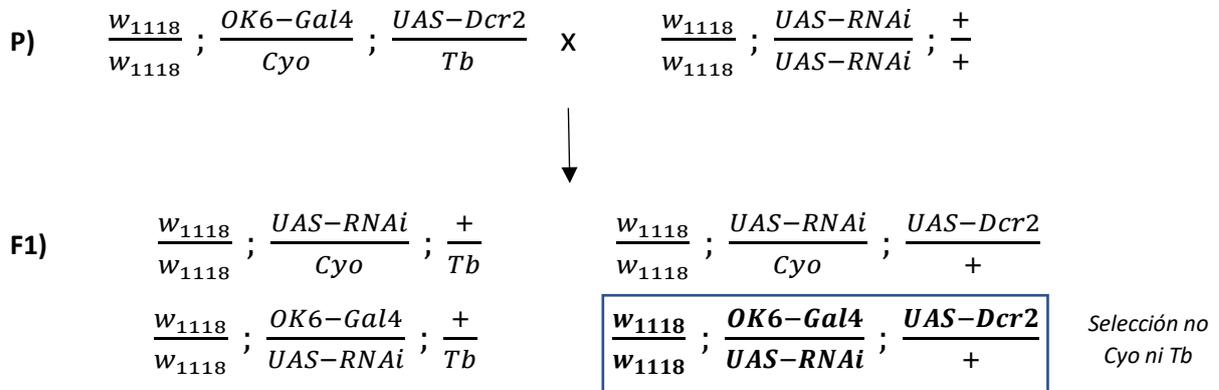


Figura 23. Esquema de cruce de moscas  $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{OK6-Gal4}{Cyo} ; \frac{UAS-Dcr2}{Tb}$  y  $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{UAS-RNAi}{UAS-RNAi} ; \frac{+}{+}$ .

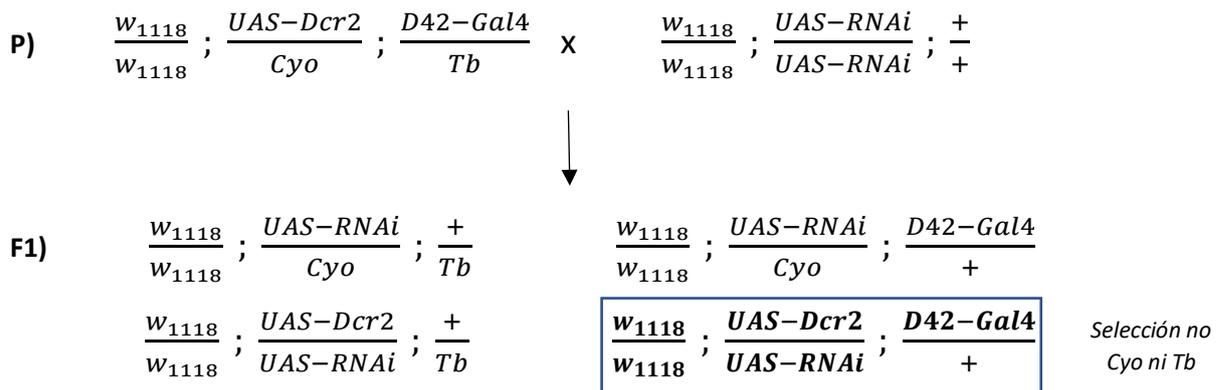


Figura 24. Esquema de cruce de moscas  $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{UAS-Dcr2}{Cyo} ; \frac{D42-Gal4}{Tb}$  y  $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{UAS-RNAi}{UAS-RNAi/Cyo} ; \frac{+}{+}$ .

De esta forma se obtuvieron los modelos de mosca con silenciamiento en motoneurona analizados en este estudio. A modo de control, ambos genotipos

$\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{UAS-Dcr2}{Cyo} ; \frac{D42-Gal4}{Tb}$  y  $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{OK6-Gal4}{Cyo} ; \frac{UAS-Dcr2}{Tb}$  se cruzaron con moscas 5905

( $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{+}{+} ; \frac{+}{+}$ ) de igual forma que la explicada anteriormente, obteniendo

$\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{OK6-Gal4}{+} ; \frac{UAS-Dcr2}{+}$  y  $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{UAS-Dcr2}{+} ; \frac{D42-Gal4}{+}$ .

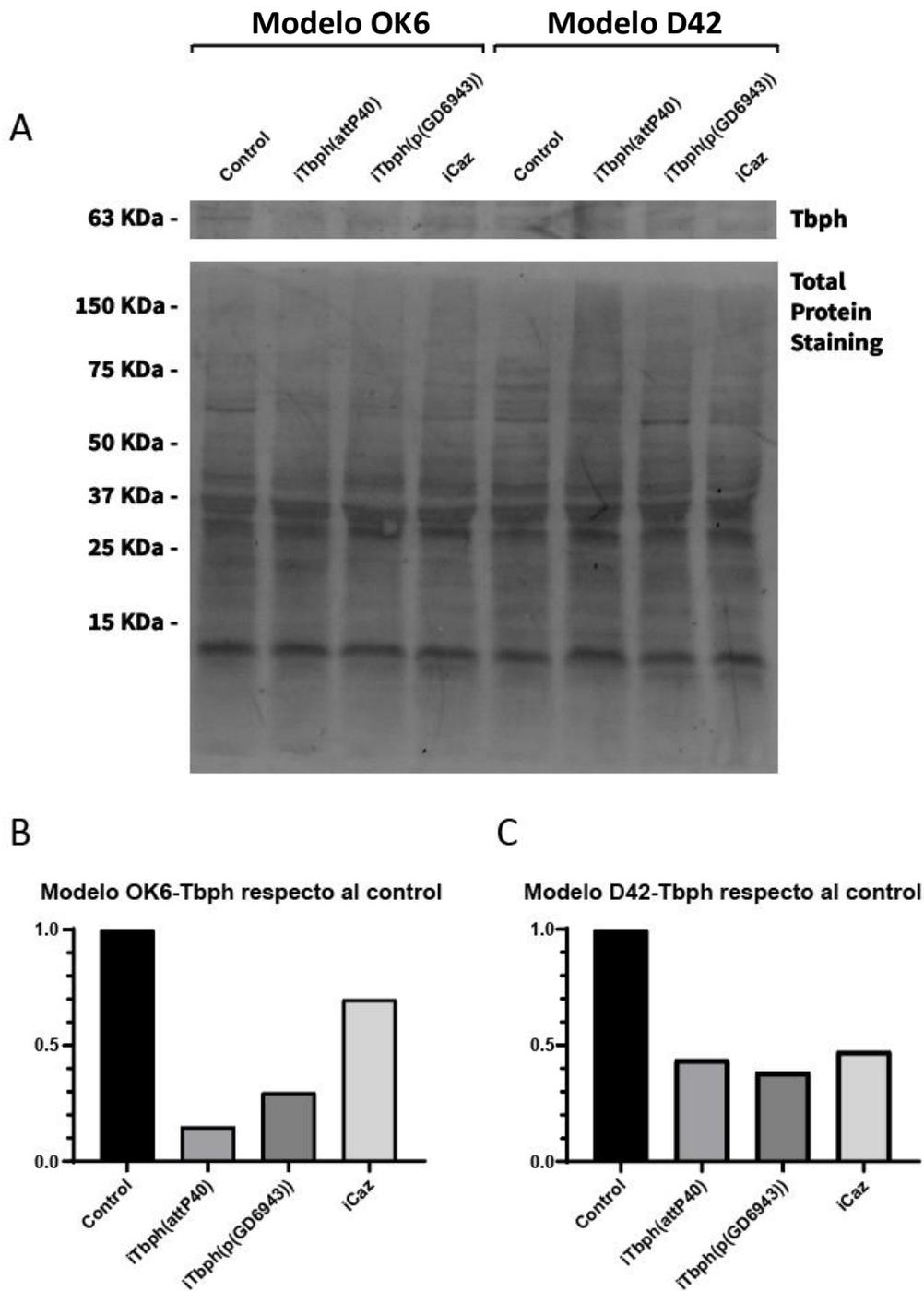
#### 4.2. Confirmación del silenciamiento de *Tbph* mediante ensayo de western blot

Con el objetivo de confirmar el silenciamiento de *Tbph* se ha realizado un inmunoblot con un anticuerpo generado y validado “in-house” mediante colaboración con el Dr. Raimundo Freire del Hospital Universitario de Canarias.

En la figura 25A se muestran los resultados sobre los niveles de *Tbph* en muestras de torax para ambos modelos de silenciamiento condicional basados en OK6 ( $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{OK6-Gal4}{UAS-RNAi} ; \frac{UAS-Dcr2}{+}$ ) y D42 ( $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{UAS-Dcr2}{UAS-RNAi} ; \frac{D42-Gal4}{+}$ ). Se analizaron los cuatro distintos genotipos (grupos) dentro de cada uno de los modelos: Control, iTbph(attP40) (secuencia UAS-TbphB en el cromosoma 2), iTbph(p(GD6943)) (secuencia UAS-Tbph401 en el cromosoma 2) e iCaz (secuencia UAS-Caz en el cromosoma 2).

Como vemos, en el caso del modelo OK6 ( $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{OK6-Gal4}{UAS-RNAi} ; \frac{UAS-Dcr2}{+}$ ), los genotipos iTbph(attP40) e iTbph(p(GD6943)) presentan unos niveles de expresión de *Tbph* muy disminuidos, confirmando el silenciamiento. Concretamente, atendiendo a la figura 25B, vemos que la relación entre la señal obtenida del genotipo iTbph(attP40) y el control es 0,15, y de 0,3 en el caso de iTbph(p(GD6943)). Por otra parte, la expresión de *Tbph* también se ve disminuida en el caso del modelo iCaz, con una relación de señal con el control de 0,7. Esto puede deberse a que, de acuerdo a estudios anteriores, los perfiles transcriptómicos de *Tbph* y FUS están relacionados, y por tanto el silenciamiento de una de ellas afecta a la expresión de la otra.<sup>47</sup>

En cuanto al modelo D42 ( $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{UAS-Dcr2}{UAS-RNAi} ; \frac{D42-Gal4}{+}$ ), la banda de *Tbph* obtenida en el western blot es menos clara, dejando entrever una menor expresión de la proteína en ambos genotipos iTbph e incluso iCaz. Atendiendo a la gráfica 25C, vemos que la relación entre la señal de los modelos de silenciamiento y el control es similar en los tres casos, con valores de alrededor de 0,4. Los resultados parecen confirmar el silenciamiento de *Tbph* en los genotipos iTbph(attP40) e iTbph(p(GD6943)). En lo referido al genotipo iCaz, la disminución puede deberse a la asociación de los perfiles transcriptómicos, como se ha comentado con anterioridad.



**Figura 25.** Los genotipos iTbph(attP40) e iTbph(p(GD6943)) de los modelos OK6 y D42 presentan silenciamiento de *Tbph*. Los niveles de expresión de *Tbph* en el genotipo iCaz se encuentran disminuidos. **A)** Expresión de *Tbph* en los genotipos Control, iTbph(attP40), iTbph(p(GD6943)) e iCaz. Protein stain para la normalización de la señal obtenida. **B)** Relación de la señal obtenida asociada a la expresión de *Tbph* respecto al grupo control del modelo OK6. **C)** Relación de la señal obtenida asociada a la expresión de *Tbph* respecto al grupo control del modelo D42.

### 4.3. Ensayo locomotor

Se caracterizaron fenotípicamente ambos modelos generados mediante la realización de un ensayo locomotor a diferentes edades, con el objetivo de ver si existe una

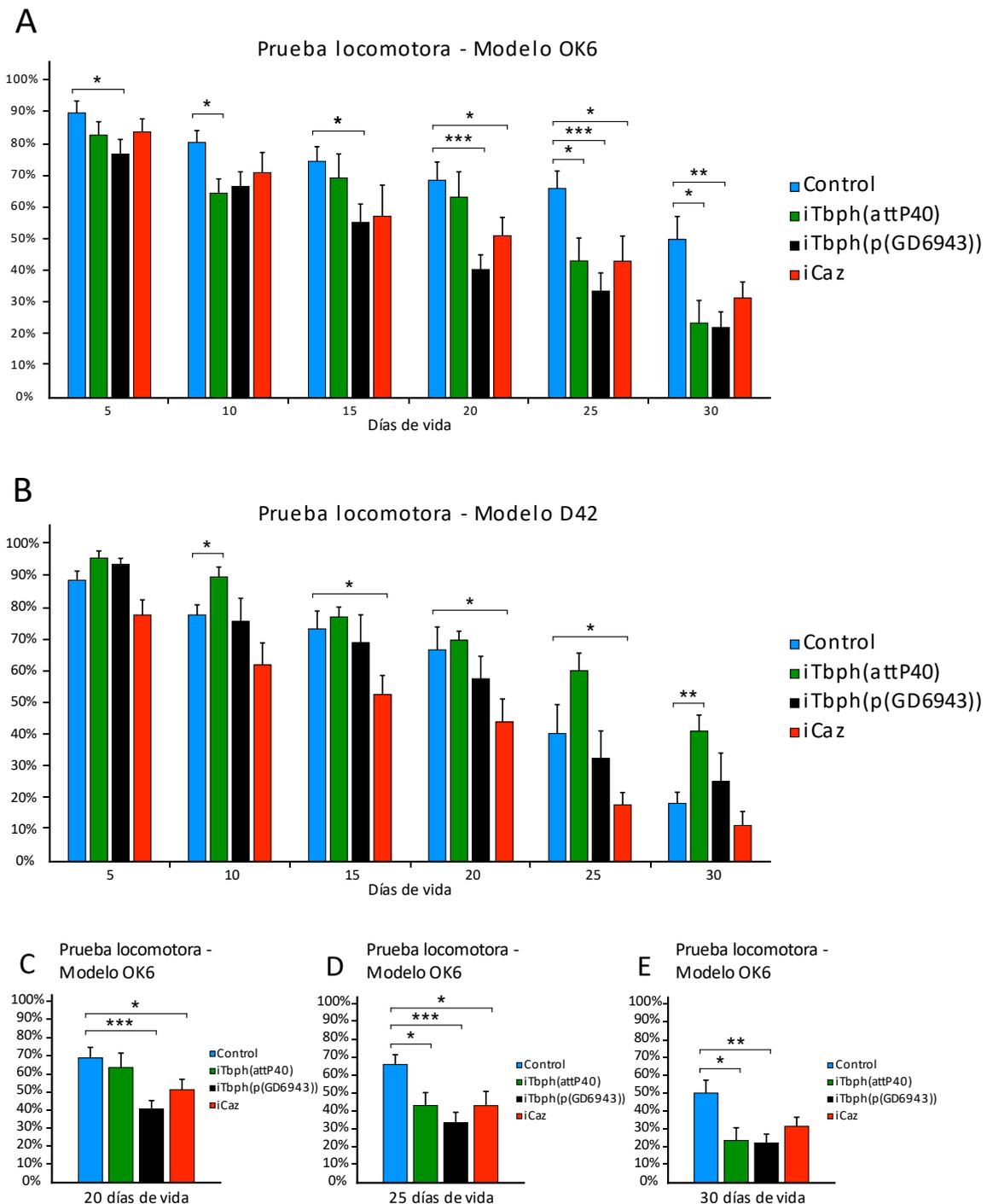
capacidad diferencial de escalada entre los distintos genotipos en estudio y, por lo tanto, el silenciamiento de los genes condiciona un fenotipo motor diferencial que sirva como screening primario de posibles nuevos fármacos. Este ensayo permitirá también seleccionar el modelo más que remede de forma más eficiente los fenotipos neuromusculares de la ELA de cara a investigaciones futuras.

En la figura 26A se muestra el análisis de los resultados obtenidos en dicho ensayo del

modelo OK6 ( $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{OK6-Gal4}{UAS-RNAi} ; \frac{DCR2}{+}$ ), incluidos los genotipos Control ( $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{OK6-Gal4}{+} ; \frac{UAS-Dcr2}{+}$ ), iTbph(attP40) ( $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{OK6-Gal4}{UAS-TBPHB\ iRNA} ; \frac{UAS-Dcr2}{+}$ ), iTbph(p(GD6943)) ( $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{OK6-Gal4}{UAS-TBPH401\ iRNA} ; \frac{UAS-Dcr2}{+}$ ) e iCaz ( $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{OK6-Gal4}{UAS-Caz\ iRNA} ; \frac{UAS-Dcr2}{+}$ ).

En cuanto al genotipo iTbph(attP40), se observa una disminución significativa en el porcentaje de escalada respecto al control a la edad de 10 días (\*p<0,05). Sin embargo, a los 15 y 20 días de edad no se mantiene dicha disminución, invitando a pensar que pudo ser provocada por factores aleatorios que pueden interferir en el resultado obtenido en la prueba. Por otro lado, en los días 25 se observa una disminución significativa más llamativa (\*p<0,05) que se mantiene a los 30 días de edad (\*p<0,05), siendo un resultado más consistente y demostrando que en dicho genotipo tiene lugar la aparición de un fenotipo locomotor deficiente entre los 25 y 30 días de edad de la mosca (Fig. 26E). Dicha edad fue seleccionada para estudiar los efectos del tratamiento con inhibidor de FoxO AS1842856 en la función locomotora.

Los resultados del genotipo iTbph(p(gd6943)) muestran la aparición temprana de un fenotipo más agresivo. A los 5 y 15 días de edad se observa una disminución significativa respecto al control (\*p<0,05), que a los 20 y 25 días pasa a ser mucho más significativa (\*\*p<0,001), y que se mantiene a los 30 días de edad (\*\*p<0,01). En este caso vemos que las diferencias con el control son más notables que en el genotipo iTbph(attP40), apareciendo un fenotipo evidente a los 20 días de edad. Esta edad fue seleccionada para el estudio del tratamiento con inhibidor de FoxO AS1842856 (Fig. 26C).



**Figura 26. El silenciamiento de *Tbph* o *Caz* provoca deficiencias motoras en el modelo OK6 .** Representados porcentajes de moscas que atraviesan la marca a 8 cm en 10 segundos respecto a sus días de edad. Valores expresados como media + error estándar. Prueba t-student \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$  ( $n \approx 10$ ). **A)** Ensayo de actividad locomotora del modelo OK6. **B)** Ensayo de actividad locomotora del modelo D42. **C)** Ensayo de actividad locomotora en día 20 del modelo OK6. Selección para el estudio con AS1842856 del genotipo iTbph(p(GD6943)). **D)** Ensayo de actividad locomotora en día 20 del modelo OK6. Selección para el estudio con AS1842856 del genotipo iCaz. **E)** Ensayo de actividad locomotora en día 20 del modelo OK6. Selección para el estudio con AS1842856 del genotipo iTbph(attP40).

Finalmente, en lo referido al genotipo de silenciamiento de *Caz* (iCaz) vemos un déficit locomotor significativo a los 20 días de edad (\*p<0,05) que se mantiene a los 25 días (\*p<0,05), seleccionando en este caso el día 25 para el estudio con inhibidor de FoxO AS1842856 (Fig. 26D). Pese a la llamativa desaparición de la significación en el día 30, la tendencia es claramente a la baja, pudiendo alcanzar valores significativos con un aumento del tamaño muestral.

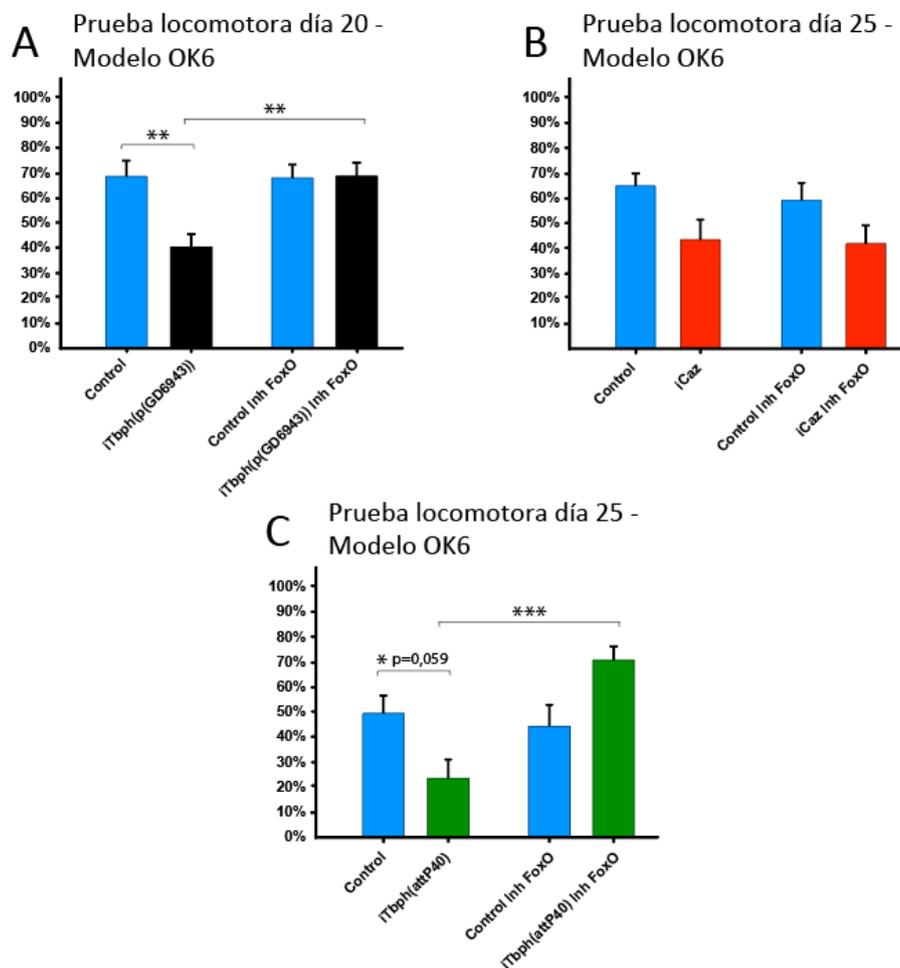
En la figura 26B se muestran los resultados del ensayo del modelo D42 ( $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{UAS-Dcr2}{UAS-RNAi} ; \frac{D42-Gal4}{+}$ ) de los genotipos Control ( $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{UAS-Dcr2}{+} ; \frac{D42-Gal4}{+}$ ), iTbph(attP40) ( $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{UAS-Dcr2}{+} ; \frac{D42-Gal4}{UAS-TBPHB\ iRNA}$ ), iTbph(p(GD6943)) ( $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{UAS-Dcr2}{+} ; \frac{D42-Gal4}{UAS-TBPH401\ iRNA}$ ) e iCaz ( $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{UAS-Dcr2}{+} ; \frac{D42-Gal4}{UAS-Caz\ iRNA}$ ).

Lo más llamativo a la hora de analizar este modelo es el déficit locomotor que se observa en el grupo control en los días 25 y 30 de edad, llegando a existir diferencias significativas con el genotipo iTbph(attP40) en el día 30 (\*\*p<0,01). La falta de un control fiable que permita relativizar los resultados del resto de genotipos impide llevar a cabo un análisis adecuado de su capacidad locomotora. Sin embargo, existen diferencias significativas con el genotipo iCaz los días 15, 20 y 25 (\*p<0,05) con respecto al control, lo cual puede indicar que la eficiencia de silenciamiento de *Caz* es alta.

De estos resultados se obtiene la conclusión de que el modelo OK6 ( $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{OK6-Gal4}{UAS-RNAi} ; \frac{UAS-Dcr2}{+}$ ) es más adecuado para estudiar llevar a cabo estudios futuros de screening farmacológico, y más concretamente en la presente ocasión sobre el efecto que pudiere ejercer el tratamiento con el inhibidor de FoxO ante un silenciamiento de *Tbph* en motoneurona. Sin embargo, el modelo D42 ( $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{UAS-Dcr2}{UAS-RNAi} ; \frac{D42-Gal4}{+}$ ) no será descartado, ya que los resultados del genotipo iCaz se ajustan a lo esperado. Además, la generación un nuevo modelo de *Drosophila* es un proceso muy complejo, por lo que previo a eliminarlo se buscará cuál es la razón del déficit mostrado por el grupo control.

#### 4.3.1. Ensayo motor en tratamiento con inhibidor de factores de transcripción FoxO

Simultáneamente a los ensayos locomotores y de longevidad de los modelos OK6 ( $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{OK6-Gal4}{UAS-RNAi} ; \frac{UAS-Dcr2}{+}$ ) y D42 ( $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{DCR2}{UAS-RNAi} ; \frac{D42}{+}$ ), se llevaron a cabo estos mismos ensayos en grupos que habían recibido tratamiento con el inhibidor de FoxO AS1842856. Esto permite analizar si el fármaco ejerce beneficios sobre la actividad locomotora a la edad en que se observa el déficit en cada genotipo. La administración del compuesto se hizo a través de la comida, añadiendo a su composición el fármaco a una concentración de 30 $\mu$ M.



**Figura 27.** El tratamiento con inhibidor de FoxO AS1842856 mejora la capacidad motora de moscas con silenciamiento de *Tbph* del modelo OK6. Representados porcentajes de moscas que atraviesan la marca a 8 cm en 10 segundos respecto a sus días de edad, con y sin el tratamiento de inhibidor de FoxO AS1842856. Valores expresados como media + error estándar. Prueba 2way ANOVA \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$  ( $n \approx 10$ ). **A)** Ensayo de actividad locomotora del genotipo iTbph(p(GD6943)) a los 20 días de edad. **B)** Ensayo de actividad locomotora del genotipo iCaz a los 25 días de edad. **C)** Ensayo de actividad locomotora en día 20 del genotipo iTbph(attp40) a los 30 días de edad.

En la figura 27A vemos que el fenotipo locomotor a los 20 días de edad del genotipo *iTbph(p(GD6943))* se recupera con la administración del tratamiento, presentando diferencias significativas entre ambos grupos (\*\* $p < 0,01$ ).

En cuanto al genotipo *iCaz* (Fig. 27B) a día 25 no se observan diferencias en el ensayo locomotor con o sin tratamiento. Se analizaron otras edades, pero no se observaron diferencias significativas en ninguna de ellas, indicando que el tratamiento no tuvo efecto sobre este genotipo.

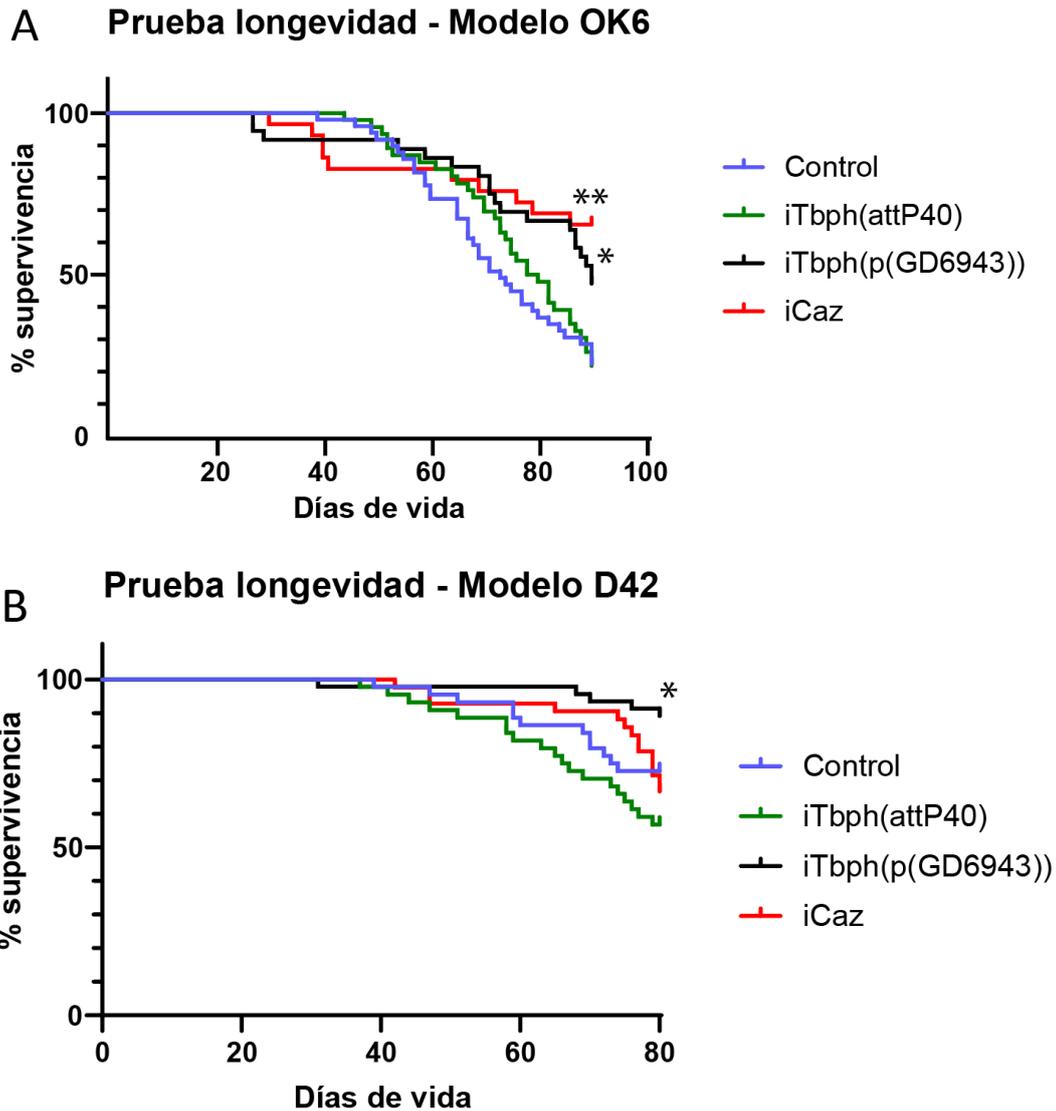
Finalmente, vemos en la figura 27C que en lo respectivo al genotipo *iTbph(attP40)* se observa una fuerte recuperación del fenotipo locomotor, presentando grandes diferencias significativas entre los grupos con y sin tratamiento (\*\* $p < 0,001$ ).

En definitiva, ambos modelos con silenciamiento de *Tbph* han aumentado su capacidad locomotora de forma considerable; sin embargo, en el caso del modelo con silenciamiento de *Caz* no se ha observado ningún efecto. Además, a los 20, 25 y 30 días de edad las moscas Control tratadas con inhibidor de FoxO mantienen la capacidad motora del control sin tratamiento, indicando que el compuesto no ejerce toxicidad a nivel neuromuscular en *Drosophila*.

#### 4.4. Ensayo de longevidad

Otra manera de investigar la existencia de cambios fisiológicos ligados a defectos neuromusculares es mediante la realización de ensayos de longevidad. La figura 28 está centrada en dicho análisis, con el fin de observar diferencias en la longevidad de los modelos generados y así tratar de asociar estas diferencias al silenciamiento de los genes *Tbph* y *Caz*.

Debido al tiempo establecido para la realización del presente TFM los resultados mostrados derivados de este ensayo no están terminados por completo. Y por ello se muestran los datos recabados hasta los 90 y 80 días de edad, a pesar de que un cierto porcentaje de moscas permanecía vivo. Sin embargo, es un tiempo suficiente en el que apreciar la aparición de un fenotipo letal en *Drosophila*, ya que su esperanza de vida es de alrededor de 100 días.



**Figura 28. Los modelos de silenciamiento de *Tbph* del modelo OK6 y el genotipo *iTbph(p(GD6943))* del modelo D42 muestran un aumento de longevidad respecto al control.** Representados porcentajes de moscas vivas respecto a sus días de edad. Prueba Mantel-Cox \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$  ( $n \approx 50$ ). **A)** Ensayo de longevidad del modelo OK6. **B)** Ensayo de longevidad del modelo D42.

En la figura 28A se muestran los resultados del ensayo durante 90 días del modelo OK6  $\left(\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{OK6-Gal4}{UAS-RNAi} ; \frac{UAS-Dcr2}{+}\right)$  de los genotipos Control (49 moscas), *iTbph(attP40)* (46 moscas), *iTbph(p(GD6943))* (36 moscas) e *iCaz* (29 moscas).

Como vemos, en contra de lo que cabría esperar, los genotipos *iTbph(p(GD6943))* e *iCaz* presentan una esperanza de vida mayor a la del control, con diferencias significativas de \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$ , respectivamente. No se observan diferencias significativas en el caso del genotipo *iTbph(attP40)*.

En cuanto a la figura 28B, vemos los resultados del ensayo durante 80 días del modelo D42 ( $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{UAS-Dcr2}{UAS-RNAi} ; \frac{D42-Gal4}{+}$ ) de los genotipos Control (44 moscas), iTbph(attP40) (44 moscas), iTbph(p(GD6943)) (46 moscas) e iCaz (42 moscas).

En este caso se observa una única diferencia significativa, de nuevo opuesta a lo esperado, del genotipo iTbph(p(GD6943)) respecto al control (\*p<0,05).

En conclusión, ambos modelos han dado resultados inesperados en el ensayo de longevidad que, a pesar de no haber finalizado, parecen indicar que ni el silenciamiento de *Tbph* ni de *Caz* han provocado un déficit en la esperanza de vida de las moscas con respecto a sus respectivos controles. En cualquier caso, contemplamos la posibilidad de que los genotipos Control, especialmente en el modelo OK6 ( $\frac{w_{1118}}{w_{1118}} ; \frac{OK6-Gal4}{UAS-RNAi} ; \frac{UAS-Dcr2}{+}$ ), exista una muerte prematura debida a factores que desconocemos, que estén enmascarando los efectos tóxicos del silenciamiento génico de *Tbph* o *Caz* en motoneurona. Por todo ello, y para mitigar esta duda, se generará el genotipo control de nuevo, y adicionalmente se medirán los niveles de expresión de Dcr-2, que en altas dosis puede resultar tóxico.

## 5. Discusión

En el presente trabajo se han obtenido y caracterizado dos nuevos modelos de *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) basados en la pérdida de función de los genes causantes de ELA, TDP-43 y FUS, mediante el silenciamiento condicionado en motoneurona de los genes ortólogos *Tbph* y *Caz*, respectivamente. Los modelos de *Drosophila* presentan grandes ventajas con respecto a otros modelos animales en cuanto a la facilidad de manejo, reducidos costes y tiempo empleado en generarlos, con lo que la mosca de la fruta se considera una herramienta *in vivo* muy útil para avanzar en el conocimiento de las enfermedades <sup>64,65</sup> y facilitar estudios de testado farmacológico *in vivo* como el realizado con el inhibidor de factores de transcripción FoxO AS1842856, en el presente proyecto de fin de máster.

La motoneurona es el principal tipo celular afectado en la ELA, <sup>52</sup> aunque se desconoce si la toxicidad se debe principalmente a mecanismos autónomos de la motoneurona o a interacciones con mecanismos no autónomos ejercidos por los otros tipos celulares que forman parte de la unión neuromuscular (Células de la glía, células del músculo esquelético). <sup>53</sup> Este postulado surge de estudios iniciales en donde se comprobó que la expresión de mutantes SOD1 restringida en motoneuronas no es suficiente para provocar signos de neurodegeneración en roedores, <sup>95,96</sup> al contrario de la vasta neurodegeneración y sintomatología ELA causada cuando estas mutaciones son expresadas en todos los tipos de células nerviosas. Un gran número de estudios más recientes han corroborado la contribución que ejercen otras células del entorno de la unión neuromuscular en la neurodegeneración y han ahondado en mecanismos específicos de toxicidad de la motoneurona no autónomos. Sin embargo, son pocos, o ninguno, los trabajos que se han dedicado al estudio de la toxicidad autónoma de la motoneurona debida a mecanismos causados por la pérdida de función de genes ELA. En el presente trabajo, el silenciamiento condicionado en motoneurona de dos genes asociados a ELA familiar, TDP-43 y FUS, ha proporcionado nuevas certezas sobre el papel que juegan los propios mecanismos de toxicidad autónomos en la motoneurona, independientemente de la contribución tóxica que ejercen otros tipos celulares.

La obtención de ambos modelos de silenciamiento condicionado en motoneurona se ha llevado a cabo con éxito, ya que son genotipos viables y razonablemente fértiles en los

que se ha podido llevar a cabo la caracterización fenotípico-funcional, así como molecular, presentando como factor diferenciador el promotor que da lugar a la transcripción de Gal-4. Tanto OK6 (o RapGap1) como D42 (o Toll-6) son genes que se expresan específicamente en motoneuronas de cerebro y del cordón nervioso ventral en *Drosophila*, por lo que el empleo de sus promotores da lugar a una transcripción condicional, específica en este tipo celular, razón por la que fueron seleccionados para este estudio.

OK6 se expresa a lo largo de todo el estadio larvario y la etapa adulta de la mosca. Esta proteína es específica de motoneurona y no se expresa en las neuronas sensoriales. Sin embargo, se ha reportado que el promotor de D42 da lugar a una expresión menos restringida a motoneurona que el de OK6. D42 se expresa en las neuronas motoras del cordón nervioso ventral, pero también en células del protocerebro y en las neuronas sensoriales periféricas.<sup>97,98</sup> Por otra parte, ciertos estudios han revelado que D42 se expresa a nivel de sistema nervioso central durante el desarrollo larvario, especialmente en las 12 primeras horas del mismo, y a nivel cerebral en las moscas adultas.<sup>99</sup>

Los resultados del western blot han mostrado una reducción en los niveles de expresión de *Tbph* en los genotipos de silenciamiento de dicha proteína tanto en el modelo OK6 como D42, y por tanto las alteraciones fenotípicas de estos modelos pueden ser legítimamente asociadas a la pérdida de función de *Tbph*. Por otro lado, los genotipos de silenciamiento de *Caz* muestran una reducción de los niveles de *Tbph* ya que, como se ha comentado con anterioridad, los perfiles transcriptómicos de ambas proteínas están relacionados entre sí.<sup>47</sup> Esto indica que los modelos se han generado correctamente ya que los resultados se encuentran dentro de lo teóricamente establecido.

El estudio del ensayo locomotor muestra deficiencias motoras en los genotipos de silenciamiento de *Tbph* o *Caz* del modelo de OK6. Sin embargo, en el modelo D42 no se ha observado dicha pérdida de la capacidad motora, a pesar de que el grado de reducción de los niveles proteicos de *Tbph* es prácticamente similar al observado en el modelo OK6. Existen una gran variedad de estudios que han analizado la capacidad locomotora en modelos con silenciamiento o sobre-expresión de *Tbph* o *Caz* en *Drosophila*. La sobre-expresión de *Tbph* (wild type o mutada) así como el silenciamiento

de esta proteína o *Caz*, a nivel de sistema nervioso central bajo la regulación del promotor *elav*, o ubicada bajo el promotor de tubulina, da lugar a deficiencias motoras en moscas adultas.<sup>47,100–102</sup> Ciertos estudios han llevado a cabo este ensayo en moscas con silenciamiento específico de *Tbph* en glía y en músculo y en ambos, la capacidad de escalada de las moscas se vio mermada.<sup>103,104</sup> Finalmente, un modelo similar a los generados en este estudio presenta una sobre-expresión específica en motoneurona de la proteína *Caz* mediante la utilización del promotor de D42. Dicho modelo estaba centrado en el estudio de la ganancia de función tóxica citoplasmática de esta proteína a nivel de motoneurona. El resultado fue, de nuevo, una afectación de la capacidad motriz.<sup>105</sup> Resulta complicado explicar por qué los modelos generados bajo la regulación del promotor OK6 han dado lugar a moscas con alteraciones motoras más severas. Una posible explicación es la regulación diferencial de estos promotores en poblaciones diferentes de motoneurona, pudiendo uno de ellos condicionar la expresión del transgén en *clusters* de motoneurona que controlan músculos y movimientos que son más necesarios para la prueba de escalada que para otras actividades motrices. En definitiva, y a falta de una explicación convincente que aclare las diferencias entre ambos modelos, los modelos generados y caracterizados hasta la actualidad han dado lugar a la aparición de un fenotipo similar al obtenido en este estudio en el modelo OK6, y por todo ello se seleccionó este modelo para el estudio de testado farmacológico con el inhibidor de FoxO AS1842856. En el caso del modelo de D42 es destacable señalar la disminución de la capacidad locomotora de las moscas control a partir de los 25 días de edad, lo cual ha podido enmascarar los efectos provocados por el silenciamiento de *Tbph* o *Caz*. En un futuro se aumentará el número de tubos analizados para cerciorarnos de que estos resultados no se han debido a un acontecimiento puntual, y en caso de repetirse se llevarán a cabo investigaciones para tratar de esclarecer qué ha podido provocar este fenómeno.

En lo referido al ensayo de longevidad, ambos modelos (OK6 vs. D42) han dado resultados inesperados, presentando un supuesto efecto protector originado por el silenciamiento de *Tbph*. Sin embargo, es importante destacar que, en ambos modelos, especialmente el OK6, la longevidad de las moscas control ha sido mucho menor a la que cabría esperar, pudiendo ocultar el efecto provocado por los silenciamientos o

mostrando la aparición de un efecto beneficioso que biológicamente no está teniendo lugar. Otros modelos caracterizados hasta la fecha muestran una menor longevidad de las moscas en estudio. Este efecto se ha comprobado en modelos de sobre-expresión o silenciamiento de *Tbph* o *Caz* con silenciamiento específico en músculo y glía, y un modelo de sobre-expresión condicionada en motoneurona de *Tbph*.<sup>47,84,100–104</sup> Sin embargo, la longevidad de un modelo con silenciamiento específico de *Tbph* o *Caz* en motoneurona no ha sido caracterizada hasta la fecha. A pesar de ello, este ensayo se repetirá tratando de discernir si este evento ha tenido lugar debido a algún fenómeno que haya podido alterar el resultado del mismo.

En el proceso de obtención de las moscas experimentales no se han observado dificultades en la eclosión de las pupas. Este hecho se contrapone a lo observado en otros modelos con silenciamiento de *Tbph* o *Caz* no específico de motoneurona, en los que un gran porcentaje de las moscas obtenidas no son capaces de salir de las pupas tras el proceso de metamorfosis, y las moscas que eclosionan tienen tiempos de supervivencia muy cortos (no más de 6 días).<sup>100,47</sup> Por otra parte, en el estudio llevado a cabo por el Dr. Gorka Gereñu con moscas con silenciamiento de *Tbph* específico en músculo (utilizando el genotipo *iTbph(p(GD6943))*) se obtuvieron resultados similares, con una muerte prematura debido a anomalías en la eclosión de casi el 100% de las moscas obtenidas. Recopilando los resultados derivados del presente proyecto y las evidencias recogidas en la literatura, se puede concluir que el silenciamiento de *Tbph* o *Caz* restringida en la motoneurona genera alteraciones fenotípicas en relación a la viabilidad, longevidad y actividad motora más leves que en modelos donde estos silenciamientos se producen de forma ubicua o restringida a la musculatura esquelética. Esta conclusión sugiere además que la pérdida de función de *Tbph* o *Caz* en motoneurona es suficiente para inducir alteraciones neuromusculares en la mosca de la fruta, y que la interacción con toxicidades provenientes de otras células del entorno es aparentemente necesaria para desencadenar o agravar el proceso neurodegenerativo de la ELA.

Finalmente, el ensayo locomotor en moscas con silenciamiento de *Tbph* o *Caz* tratadas con inhibidor de FoxO AS1842856 ha dado como resultado un aumento de la capacidad

locomotora de ambos genotipos de silenciamiento de *Tbph* en el modelo OK6. Sin embargo, no se han observado cambios en el modelo de silenciamiento de *Caz*.

Los factores de transcripción FoxO son fundamentales para la activación del sistema ubiquitin-proteasoma y la autofagia, así como para la degradación de proteínas mal plegadas u orgánulos deteriorados. Por ello, la respuesta fisiológica mediada por FoxO ante un estrés celular es necesaria para el mantenimiento de la viabilidad y supervivencia de la célula.<sup>62</sup> Estudios realizados en el grupo de investigación donde se desarrolla el presente trabajo demostraron que en mioblastos deficientes en TDP-43 o FUS, y en mioblastos primarios derivados de pacientes con ELA, FoxO1 se encuentra sobre-expresado en el núcleo y reprime la capacidad de diferenciación miogénica, lo que invita a especular que la puesta en marcha de los fenómenos atróficos, entre ellos, la degradación de proteínas a través del sistema ubiquitin-proteasoma, podría deberse a la desregulación de estos factores, provocando eventualmente la inhibición parcial o completa del proceso de diferenciación celular y, finalmente, la muerte celular. Diversos estudios han demostrado que la inhibición de los factores de transcripción FoxO1 y FoxO3 produce numerosos efectos beneficiosos para el sistema nervioso, entre ellos la protección de la muerte de la glía por estrés oxidativo, la aparición de efectos protectores mediados por los receptores glutamérgicos metabotrópicos<sup>106</sup> o el aumento de la supervivencia neuronal.<sup>107</sup> Otro de los mecanismos por los cuales la inhibición de FoxO en los modelos de mosca con silenciamiento de *Tbph* restringido a motoneurona ha sido capaz de aliviar los defectos locomotores puede estar mediado por la estabilización del citoesqueleto de microtúbulos en la unión neuromuscular. Se ha descrito que FoxO limita la estabilidad de los microtúbulos en la unión y que su inhibición puede generar una respuesta protectora frente a daños que comprometen la estabilidad de la unión neuromuscular,<sup>108</sup> como es el caso de la pérdida de función de TDP-43 en neurona.<sup>109,110</sup> Esto, junto con las evidencias de la inducción de la apoptosis en neuronas y la atrofia muscular provocada por la sobre-activación de estos factores, indican que la inhibición de FoxO puede funcionar como estrategia terapéutica para la ELA.

En este contexto, los resultados obtenidos mediante el tratamiento con inhibidor de FoxO AS1842856 en los modelos de silenciamiento de *Tbph* concuerdan con lo esperado

tras la revisión bibliográfica. Por otra parte, estos resultados coinciden con los obtenidos por el Dr. Gorka Gereñu en un modelo de *Drosophila* con silenciamiento condicionado de *Tbph* o *Caz* en músculo, en los cuales el tratamiento con este inhibidor aumentaba la capacidad locomotora de las moscas experimentales (Ref. EP20382444). En lo referido al modelo de silenciamiento de *Caz*, se llevarán a cabo futuras investigaciones para tratar de analizar los resultados obtenidos en este ensayo.

Finalmente, los modelos de silenciamiento de genes ELA restringido a motoneurona en mosca de la fruta, en concreto el modelo OK6-Gal4, UAS- iTbph(p(GD6943)), pueden ser útiles como herramienta de cribado farmacológico en función de la respuesta locomotora, pero el testado farmacológico debería implementarse en modelos de silenciamiento ubicuo en sistema nervioso donde los fenotipos son más agresivos y compatibles con la neurodegeneración de la ELA.

Como perspectiva de futuro, el presente trabajo ha asentado las bases sobre las cuales construir un ambicioso proyecto que dará lugar a la realización de una tesis doctoral que buscará estudiar la contribución de los diferentes tipos celulares implicados en la unión neuromuscular en la patogénesis de la ELA de cada uno. Se estudiará el efecto del inhibidor de FoxO sobre cada uno de ellos, así como otros compuestos mediante la utilización de *Drosophila melanogaster* como modelo, que puedan tratar de paliar los terribles efectos provocados por esta enfermedad.

## 6. Conclusiones

Tras la exposición y discusión de los resultados obtenidos en este proyecto podemos extraer las siguientes conclusiones:

- 1- La generación de los modelos de *Drosophila melanogaster* con silenciamiento condicionado en motoneurona de *Tbph* o *Caz* ha sido llevada a cabo con éxito.
- 2- El silenciamiento específico en motoneurona de los genes *Tbph* o *Caz* ha provocado un déficit en la capacidad locomotora del modelo generado con el promotor de la proteína OK6.
- 3- El silenciamiento condicionado en motoneurona de los genes *Tbph* o *Caz* no ha provocado una disminución en la longevidad de los modelos.
- 4- La pérdida de función de *Tbph* o *Caz* en motoneurona es suficiente para inducir alteraciones neuromusculares en la mosca de la fruta, a pesar de que la interacción con toxicidades provenientes de otras células del entorno es aparentemente necesaria para desencadenar o agravar el proceso neurodegenerativo de la ELA.
- 5- El tratamiento con inhibidor de FoxO AS1842856 ha recuperado la capacidad motriz de moscas con silenciamiento de *Tbph* en motoneurona.
- 6- Los modelos de silenciamiento de genes ELA restringido a motoneurona en mosca de la fruta, en concreto el modelo OK6-Gal4, UAS-iTbph(P{GD6943}), pueden ser útiles como herramienta de cribado farmacológico en función de la respuesta locomotora.

## Conclusions

After exposing and discussing the results obtained in this project, we can draw the following conclusions:

- 1- The generation of the models of *Drosophila melanogaster* with conditioned silencing in motor neuron of *Tbph* or *Caz* has been carried out successfully.
- 2- The specific silencing in the motor neuron of the *Tbph* or *Caz* genes has caused a deficit in the locomotor capacity of the model generated with the OK6 protein promoter.
- 3- The conditioned silencing in the motor neuron of the *Tbph* or *Caz* genes has not caused a decrease in the longevity of the models.
- 4- The function loss of *Tbph* or *Caz* in the motor neuron is sufficient to induce neuromuscular alterations in the fruit fly, despite the fact that the interaction with toxicities from other cells in the environment is apparently necessary to trigger or aggravate the neurodegenerative process of ALS.
- 5- Treatment with FoxO inhibitor AS1842856 has recovered the motor capacity of flies with silencing of *Tbph* in motor neuron.
- 6- Motor neuron-restricted ALS gene silencing models in fruit flies, specifically the OK6-Gal4 model, UAS-iTbph(P(GD6943)), may be useful as a pharmacological screening tool based on the locomotor response.

## 7. Bibliografía

1. Hardiman, O. *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **3**, (2017).
2. Oskarsson, B., Gendron, T. F. & Staff, N. P. Amyotrophic Lateral Sclerosis: An Update for 2018. *Mayo Clin. Proc.* **93**, 1617–1628 (2018).
3. Brown, R. H. & Al-Chalabi, A. Amyotrophic lateral sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **377**, 162–172 (2017).
4. Zarei, S. *et al.* A comprehensive review of amyotrophic lateral sclerosis. *Surg. Neurol. Int.* **6**, (2015).
5. Riancho, J., Gonzalo, I., Ruiz-Soto, M. & Berciano, J. Why do motor neurons degenerate? Actualization in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurologia* **34**, 27–37 (2019).
6. Robberecht, W. & Philips, T. The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Rev. Neurosci.* **14**, 248–264 (2013).
7. Lefebvre, S. *et al.* Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* **80**, 155–165 (1995).
8. Simpson, E. P., Henry, Y. K., Henkel, J. S., Smith, R. G. & Appel, S. H. Increased lipid peroxidation in sera of ALS patients: A potential biomarker of disease burden. *Neurology* **62**, 1758–1765 (2004).
9. Smith, R. G., Henry, Y. K., Mattson, M. P. & Appel, S. H. Presence of 4-hydroxynonenal in cerebrospinal fluid of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* **44**, 696–699 (1998).
10. Blokhuis, A. M., Groen, E. J. N., Koppers, M., Van Den Berg, L. H. & Pasterkamp, R. J. Protein aggregation in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol.* **125**, 777–794 (2013).
11. Lee J, M. Neuronal Death in Amyotrophic Lateral Sclerosis Is Apoptosis: Possible Contribution of a Programmed Cell Death Mechanism. **58**, 459–471 (1999).
12. Raška, I., Shaw, P. J. & Cmarko, D. New Insights into Nucleolar Architecture and Activity. *Int. Rev. Cytol.* **255**, 177–235 (2006).
13. Boulon, S., Westman, B. J., Hutten, S., Boisvert, F. M. & Lamond, A. I. The Nucleolus under Stress. *Mol. Cell* **40**, 216–227 (2010).
14. Bendotti, C. *et al.* Dysfunction of constitutive and inducible ubiquitin-proteasome system in amyotrophic lateral sclerosis: Implication for protein aggregation and immune response. *Prog. Neurobiol.* **97**, 101–126 (2012).
15. Riancho, J., Ruiz-Soto, M., Berciano, M. T., Berciano, J. & Lafarga, M. Neuroprotective effect of bexarotene in the SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Front. Cell. Neurosci.* **9**, 1–17 (2015).
16. Kraft, C., Peter, M. & Hofmann, K. Selective autophagy: Ubiquitin-mediated recognition and beyond. *Nat. Cell Biol.* **12**, 836–841 (2010).
17. Tashiro, Y. *et al.* Motor neuron-specific disruption of proteasomes, but not autophagy, replicates amyotrophic lateral sclerosis. *J. Biol. Chem.* **287**, 42984–42994 (2012).
18. De vos, K. J. *et al.* Familial amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutants perturb fast axonal transport to reduce axonal mitochondria content. *Hum. Mol. Genet.* **16**, 2720–2728 (2007).
19. Miller, K. E. & Sheetz, M. P. Axonal mitochondrial transport and potential are correlated. *J. Cell Sci.* **117**, 2791–2804 (2004).
20. C Bergeron , K Beric-Maskarel, S Muntasser, L Weyer, M J Somerville, M. E. P. Neurofilament light and polyadenylated mRNA levels are decreased in amyotrophic lateral sclerosis motor

- neurons. (1994).
21. Hooten, K. G., Beers, D. R., Zhao, W. & Appel, S. H. Protective and Toxic Neuroinflammation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotherapeutics* **12**, 364–375 (2015).
  22. Puentes, F., Malaspina, A., Van Noort, J. M. & Amor, S. Non-neuronal cells in ALS: Role of glial, immune cells and blood-CNS barriers. *Brain Pathol.* **26**, 248–257 (2016).
  23. Appel, S. H., Smith, R. G., Engelhardt, J. I. & Stefani, E. Evidence for autoimmunity in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* **124**, 14–19 (1993).
  24. Philips, T. & Robberecht, W. Neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: Role of glial activation in motor neuron disease. *Lancet Neurol.* **10**, 253–263 (2011).
  25. Henkel, J. S. *et al.* Regulatory T-lymphocytes mediate amyotrophic lateral sclerosis progression and survival. *EMBO Mol. Med.* **5**, 64–79 (2013).
  26. Chiò, A. *et al.* The multistep hypothesis of ALS revisited. *Neurology* **91**, e635–e642 (2018).
  27. Björn Oskarsson, D. Kevin Horton, & H. M. Potential Environmental Factors in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Physiol. Behav.* **33**, 877–888 (2015).
  28. Renton, A. E., Chiò, A., Traynor, B. J. & Neurosci, N. State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics HHS Public Access Author manuscript. *Nat Neurosci* **17**, 17–23 (2014).
  29. Van Damme, P., Robberecht, W. & Van Den Bosch, L. Modelling amyotrophic lateral sclerosis: Progress and possibilities. *DMM Dis. Model. Mech.* **10**, 537–549 (2017).
  30. Pansarasa, O. *et al.* Sod1 in amyotrophic lateral sclerosis: “ambivalent” behavior connected to the disease. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 1–13 (2018).
  31. Mejzini, R. *et al.* ALS Genetics, Mechanisms, and Therapeutics: Where Are We Now? *Front. Neurosci.* **13**, 1–27 (2019).
  32. Ezzi, S. A., Urushitani, M. & Julien, J. P. Wild-type superoxide dismutase acquires binding and toxic properties of ALS-linked mutant forms through oxidation. *J. Neurochem.* **102**, 170–178 (2007).
  33. Rakhit, R. *et al.* Oxidation-induced misfolding and aggregation of superoxide dismutase and its implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J. Biol. Chem.* **277**, 47551–47556 (2002).
  34. Ayers, J. I., Fromholt, S. E., O’Neal, V. M., Diamond, J. H. & Borchelt, D. R. Prion-like propagation of mutant SOD1 misfolding and motor neuron disease spread along neuroanatomical pathways. *Acta Neuropathol.* **131**, 103–114 (2016).
  35. Pokrishevsky, E., Grad, L. I. & Cashman, N. R. TDP-43 or FUS-induced misfolded human wild-type SOD1 can propagate intercellularly in a prion-like fashion. *Sci. Rep.* **6**, 1–10 (2016).
  36. Sábado, J. *et al.* Accumulation of misfolded SOD1 in dorsal root ganglion degenerating proprioceptive sensory neurons of transgenic mice with amyotrophic lateral sclerosis. *Biomed Res. Int.* **2014**, (2014).
  37. TARBDP Gene (Protein coding). <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TARBDP>.
  38. Chen, S., Sayana, P., Zhang, X. & Le, W. Genetics of amyotrophic lateral sclerosis: An update. *Mol. Neurodegener.* **8**, 1 (2013).
  39. Dewey, C. M. *et al.* TDP-43 Is Directed to Stress Granules by Sorbitol, a Novel Physiological Osmotic and Oxidative Stressor. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 1098–1108 (2011).
  40. Shorter, J. The mammalian disaggregase machinery: Hsp110 synergizes with Hsp70 and Hsp40 to catalyze protein disaggregation and reactivation in a cell-free system. *PLoS One* **6**, (2011).
  41. Dewey, C. M. TDP-43 Aggregation In Neurodegeneration: Are Stress Granules The Key? 16–25

- (2012) doi:10.1038/jid.2014.371.
42. Cascella, R. *et al.* Quantification of the Relative Contributions of Loss-of-function and Gain-of-function Mechanisms in TAR DNA-binding Protein 43 (TDP-43) Proteinopathies. *J. Biol. Chem.* **291**, 19437–19448 (2016).
  43. Higashi, S., Tsuchiya, Y., Araki, T., Wada, K. & Kabuta, T. TDP-43 physically interacts with amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant CuZn superoxide dismutase. *Neurochem. Int.* **57**, 906–913 (2010).
  44. FUS Gene (Protein coding). <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FUS>.
  45. Honda, D. *et al.* The ALS/FTLD-related RNA-binding proteins TDP-43 and FUS have common downstream RNA targets in cortical neurons. *FEBS Open Bio* **4**, 1–10 (2014).
  46. Kabashi, E. *et al.* Fus and tardbp but not sod1 interact in genetic models of amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS Genet.* **7**, 17–28 (2011).
  47. Wang, J., Brent, J. R., Tomlinson, A., Shneider, N. A. & McCabe, B. D. The fatal adult motor neuron disease amyotrophic lateral sclerosis ( ALS ) shares some clinical and pathological overlap with frontotemporal dementia ( FTD ), an early-onset neurodegenerative disorder . The RNA / DNA- binding proteins fused in sarcoma ( . **121**, 4118–4126 (2011).
  48. C9orf72 Gene (Protein coding). <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=C9orf72&keywords=C9orf72>.
  49. Balendra, R. & Isaacs, A. M. *Europe PMC Funders Group C9orf72 -mediated ALS and FTD : multiple pathways to disease.* vol. 14 (2019).
  50. Krakora, D., MacRander, C. & Suzuki, M. Neuromuscular junction protection for the potential treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol. Res. Int.* **2012**, (2012).
  51. Lepore, E., Casola, I., Dobrowolny, G. & Musarò, A. Neuromuscular Junction as an Entity of Nerve-Muscle Communication. *Cells* **8**, 906 (2019).
  52. Ferraiuolo, L., Kirby, J., Grierson, A. J., Sendtner, M. & Shaw, P. J. Molecular pathways of motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.* **7**, 616–630 (2011).
  53. Lee, J. *et al.* Astrocytes and microglia as non-cell autonomous players in the pathogenesis of ALS. *Exp. Neurol.* **25**, 233–240 (2016).
  54. Campanari, M. L., Bourefis, A. R. & Kabashi, E. Diagnostic challenge and neuromuscular junction contribution to ALS pathogenesis. *Front. Neurol.* **10**, 1–8 (2019).
  55. Dadon-Nachum, M., Melamed, E. & Offen, D. The ‘dying-back’ phenomenon of motor neurons in ALS. *J. Mol. Neurosci.* **43**, 470–477 (2011).
  56. Edaravone. [https://www.drugs.com/mtm\\_esp/edaravone.html](https://www.drugs.com/mtm_esp/edaravone.html).
  57. Glauser, D. A. & Schlegel, W. The emerging role of FOXO transcription factors in pancreatic  $\beta$  cells. *J. Endocrinol.* **193**, 195–207 (2007).
  58. Altomonte, J. *et al.* Inhibition of Foxo1 function is associated with improved fasting glycemia in diabetic mice. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **285**, 718–728 (2003).
  59. Matsumoto, M., Poci, A., Rossetti, L., DePinho, R. A. & Accili, D. Impaired Regulation of Hepatic Glucose Production in Mice Lacking the Forkhead Transcription Factor Foxo1 in Liver. *Cell Metab.* **6**, 208–216 (2007).
  60. Abeliovich, A., Manuscript, A. & Edward B. Lee, Virginia M.-Y. Lee, and J. Q. T. Gains or losses: molecular mechanisms of TDP43-mediated neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* **13**, 38–50 (2012).
  61. Zhang, T., Baldie, G., Periz, G. & Wang, J. RNA-Processing Protein TDP-43 Regulates FOXO-

- Dependent Protein Quality Control in Stress Response. *PLoS Genet.* **10**, (2014).
62. Dervis A M Salih and Anne Brune. FoxO transcription factors in the maintenance of cellular homeostasis during aging. **20**, 126–136 (2009).
  63. McGurk, L., Berson, A. & Bonini, N. M. *Drosophila* as an in vivo model for human neurodegenerative disease. *Genetics* **201**, 377–402 (2015).
  64. Pandey, U. B. & Nichols, C. D. Human Disease Models in *Drosophila melanogaster* and the Role of the Fly in Therapeutic Drug Discovery. *Pharmacol. Rev.* **63**, 411–436 (2011).
  65. Prokop, A. A rough guide to *Drosophila* mating schemes (version 6.2). *Neuron* **72**, 202–230 (2015).
  66. Watson, M. R., Lagow, R. D., Xu, K., Zhang, B. & Bonini, N. M. A *Drosophila* model for amyotrophic lateral sclerosis reveals motor neuron damage by human SOD1. *J. Biol. Chem.* **283**, 24972–24981 (2008).
  67. Sepehr Bahadorani, Spencer Mukai, Jason Rabie, Joseph S. Beckman, J. P. & Phillips, and A. J. H. Expression of zinc-deficient human SOD1 in *Drosophila* neurons produces a locomotor defect linked to mitochondrial dysfunction. **34**, 2322–2330 (2013).
  68. Mizielińska, S. *et al.* C9orf72 repeat expansions cause neurodegeneration in *Drosophila* through arginine-rich proteins. *Science (80-. )*. **345**, 1192–1194 (2014).
  69. Freibaum, B. D. *et al.* GGGGCC repeat expansion in C9ORF72 compromises nucleocytoplasmic transport. **525**, 129–133 (2016).
  70. Yan, X. Expanded GGGGCC repeat RNA associated with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia causes neurodegeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2017 (2017) doi:10.1073/pnas.
  71. Elden, A. C. *et al.* Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS. *Nature* **466**, 1069–1075 (2010).
  72. Kim, H. *et al.* TDP-43 toxicity in amyotrophic lateral sclerosis disease models. *Nat. Genet.* **46**, 152–160 (2014).
  73. Azuma, Y. *et al.* Identification of ter94, *Drosophila* VCP, as a strong modulator of motor neuron degeneration induced by knockdown of *Caz*, *Drosophila* FUS. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 3467–3480 (2014).
  74. Mushtaq, Z., Choudhury, S. D., Gangwar, S. K., Orso, G. & Kumar, V. Human senataxin modulates structural plasticity of the neuromuscular junction in *Drosophila* through a neuronally conserved TGFβ signalling pathway. *Neurodegener. Dis.* **16**, 324–336 (2016).
  75. Kim, H. J. *et al.* Prion-like domain mutations in hnRNPs cause multisystem proteinopathy and ALS. *Nature* **495**, 467–473 (2013).
  76. Li, Y. *et al.* A *Drosophila* model for TDP-43 proteinopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 3169–3174 (2010).
  77. Feiguin, F. *et al.* Depletion of TDP-43 affects *Drosophila* motoneurons terminal synapsis and locomotive behavior. *FEBS Lett.* **583**, 1586–1592 (2009).
  78. Lu, Y., Ferris, J. & Gao, F. B. Frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis-associated disease protein TDP-43 promotes dendritic branching. *Mol. Brain* **2**, 1–10 (2009).
  79. Gregory, J. M., Barros, T. P., Meehan, S., Dobson, C. M. & Luheshi, L. M. The aggregation and neurotoxicity of TDP-43 and its als-associated 25 kDa fragment are differentially affected by molecular chaperones in *Drosophila*. *PLoS One* **7**, (2012).
  80. Hiroyuki Uechi, Erina Kuranaga, Tomohiro Iriki, Kohei Takano, Shoshiro Hirayama, Masayuki

- Miura, Jun Hamazaki, A. & Murataa-, S. Ubiquitin-Binding Protein CG5445 Suppresses Aggregation and Cytotoxicity of Amyotrophic Lateral Sclerosis-Linked TDP-43 in *Drosophila*. 1–14 (2018).
81. Langelotti, S. *et al.* A novel *Drosophila* model of TDP-43 proteinopathies: N-terminal sequences combined with the Q/N domain induce protein functional loss and locomotion defects. *DMM Dis. Model. Mech.* **9**, 659–669 (2016).
  82. Cragnaz, L. *et al.* Aggregate formation prevents dTDP-43 neurotoxicity in the *Drosophila melanogaster* eye. *Neurobiol. Dis.* **71**, 74–80 (2014).
  83. Estes, P. S. *et al.* Motor neurons and glia exhibit specific individualized responses to TDP-43 expression in a *Drosophila* model of amyotrophic lateral sclerosis. *DMM Dis. Model. Mech.* **6**, 721–733 (2013).
  84. Coyne, A. N. *et al.* FUTSCH/MAP1B mRNA is a translational target of TDP-43 and is neuroprotective in a *Drosophila* model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurosci.* **34**, 15962–15974 (2014).
  85. Frickenhaus, M., Wagner, M., Mallik, M., Catinozzi, M. & Storkebaum, E. Highly efficient cell-type-specific gene inactivation reveals a key function for the *Drosophila* FUS homolog cabeza in neurons. *Sci. Rep.* **5**, (2015).
  86. Jäckel, S. *et al.* Nuclear import factor transportin and arginine methyltransferase 1 modify FUS neurotoxicity in *Drosophila*. *Neurobiol. Dis.* **74**, 76–88 (2015).
  87. Lanson, N. A. *et al.* A *Drosophila* model of FUS-related neurodegeneration reveals genetic interaction between FUS and TDP-43. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 2510–2523 (2011).
  88. Machamer, J. B., Collins, S. E. & Lloyd, T. E. The ALS gene FUS regulates synaptic transmission at the *Drosophila* neuromuscular junction. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 3810–3822 (2014).
  89. Xia, R. *et al.* Motor neuron apoptosis and neuromuscular junction perturbation are prominent features in a *Drosophila* model of Fus-mediated ALS. *Mol. Neurodegener.* **7**, 1–17 (2012).
  90. Kavi, H. H., Fernandez, H. R., Xie, W. & Birchler, J. A. RNA silencing in *Drosophila*. *FEBS Lett.* **579**, 5940–5949 (2005).
  91. Pulver, S. R. & Berni, J. The fundamentals of flying: Simple and inexpensive strategies for employing *Drosophila* genetics in neuroscience teaching laboratories. *J. Undergrad. Neurosci. Educ.* **11**, (2012).
  92. Chyb, S. & Gompel, N. Body markers. *Atlas Drosoph. Morphol.* 163–175 (2013) doi:10.1016/b978-0-12-384688-4.00007-9.
  93. Chyb, S. & Gompel, N. Bristle markers. *Atlas Drosoph. Morphol.* 25–55 (2013) doi:10.1016/b978-0-12-384688-4.00002-x.
  94. Chyb, S. & Gompel, N. Wing markers. *Atlas Drosoph. Morphol.* 57–87 (2013) doi:10.1016/b978-0-12-384688-4.00003-1.
  95. Pramatarova, A., Laganière, J., Roussel, J., Brisebois, K. & Rouleau, G. A. Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase 1 in transgenic mice does not lead to motor impairment. *J. Neurosci.* **21**, 3369–3374 (2001).
  96. Lino, M. M., Schneider, C. & Caroni, P. Accumulation of SOD1 Mutants in Postnatal Motoneurons Does Not Cause Motoneuron Pathology or Motoneuron Disease. *J. Neurosci.* **22**, 4825–4832 (2002).
  97. Lembke, K. M., Scudder, C. & Morton, D. B. Restoration of motor defects caused by loss of *Drosophila* TDP-43 by expression of the voltage-gated calcium channel, cacophony, in central neurons. *J. Neurosci.* **37**, 9486–9497 (2017).

98. Sanyal, S. Genomic mapping and expression patterns of C380, OK6 and D42 enhancer trap lines in the larval nervous system of *Drosophila*. *Gene Expr. Patterns* **9**, 371–380 (2009).
99. Mcilroy, G. *et al.* Toll-6 and Toll-7 function as neurotrophin receptors in the *Drosophila* central nervous system. *Nat. Neurosci.* **16**, 1248–1256 (2015).
100. Donde, A. *et al.* Upregulation of ATG7 attenuates motor neuron dysfunction associated with depletion of TARDBP/TDP-43. *Autophagy* **16**, 672–682 (2020).
101. Cragnaz, L. *et al.* An age-related reduction of brain *TBPH/TDP-43* levels precedes the onset of locomotion defects in a *Drosophila* ALS model. *Neuroscience* **311**, 415–421 (2015).
102. Romano, G. *et al.* Chronological requirements of TDP-43 function in synaptic organization and locomotive control. *Neurobiol. Dis.* **71**, 95–109 (2014).
103. Strah, N. *et al.* TDP-43 promotes the formation of neuromuscular synapses through the regulation of Disc-large expression in *Drosophila* skeletal muscles. *BMC Biol.* **18**, 1–13 (2020).
104. Romano, G. *et al.* Glial TDP-43 regulates axon wrapping, GluRIIA clustering and fly motility by autonomous and non-autonomous mechanisms. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 6134–6145 (2015).
105. Walters, R., Manion, J. & Neely, G. G. Dissecting motor neuron disease with *Drosophila melanogaster*. *Front. Neurosci.* **13**, 1–14 (2019).
106. Maiese, K., Chong, Z. Z., Hou, J. & Shang, Y. C. Oxidative stress: Biomarkers and novel therapeutic pathways. *Exp. Gerontol.* **45**, 217–234 (2010).
107. Chong, Z. Z., Lin, S. H. & Maiese, K. The NAD<sup>+</sup> precursor nicotinamide governs neuronal survival during oxidative stress through protein kinase B coupled to FOXO3a and mitochondrial membrane potential. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **24**, 728–743 (2004).
108. Nechipurenko, I. V. & Broihier, H. T. FoxO limits microtubule stability and is itself negatively regulated by microtubule disruption. *J. Cell Biol.* **196**, 345–362 (2012).
109. Diaper, D. C. *et al.* Loss and gain of *Drosophila* TDP-43 impair synaptic efficacy and motor control leading to age-related neurodegeneration by loss-of-function phenotypes. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 1539–1557 (2013).
110. Bose, P., Armstrong, G. A. B. & Drapeau, P. Neuromuscular junction abnormalities in a zebrafish loss-of-function model of TDP-43. *J. Neurophysiol.* **121**, 285–297 (2019).