



MEDIKUNTZA
ETA ERIZAINNTZA
FAKULTATEA
FACULTAD
DE MEDICINA
Y ENFERMERÍA

50
URTE
AÑOS

Gradu Amaierako Lana / Trabajo Fin de Grado

Medikuntza Gradua / Grado en Medicina

Silenciamiento tejido específico *in-vivo* de genes causantes de ELA para identificar el desencadenante primario de la degeneración de la motoneurona. /

Tissue specific *in-vivo* silencing of ALS mendelian genes to identify the primary trigger of neurodegeneration in the disease.

Egilea /Autor:

Sara Gonzalez de Alaiza

Zuzendariak / Director/a/s:

Adolfo Lopez de Munain y Gorka Gereñu

RESUMEN

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es un síndrome neurodegenerativo raro de etiología incierta con desenlace fatal, en el cual un 10% de los casos son formas familiares causadas principalmente por 4 genes, entre ellos TARDBP y FUS. El objetivo ha sido conseguir un modelo de *Drosophila melanogaster* con silenciamiento tejido específico de los genes ortólogos de TARDBP y FUS. Concretamente el silenciamiento se ha inducido en glía y en músculo, tipos celulares que junto con la motoneurona integran la unión neuromuscular, y complementariamente se han realizado ensayos experimentales para detectar diferencias en el fenotipo locomotor de las moscas con silenciamiento de estos genes en músculo. El propósito final sería identificar si estos tejidos podrían desencadenar la degeneración de la motoneurona, consolidando la hipótesis de la ELA como enfermedad periférica primariamente metabólica. Este trabajo fin de grado aborda las primeras fases de este ambicioso proyecto.

ABSTRACT

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a rare neurodegenerative syndrome that has an unknown aetiology with a tragic ending, in which 10% of all cases are familiar forms caused fundamentally by 4 genes, TARDBP and FUS among them. The aim has been to generate a model of *Drosophila melanogaster* with tissue-specific silencing of orthologous genes of TARDBP and FUS. We have chosen glial and muscular tissues for the silencing because they take part of the neuromuscular junction and additionally, some experimental trials have been made in order to detect differences in the locomotor phenotype which had these genes silenced in muscle. The final goal will be to identify if these tissues could trigger neurodegeneration, supporting the theory of ELA being a peripheral primarily metabolic disease. This final degree project is focused on the first phase of this ambitious project.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 EPIDEMIOLOGÍA

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es un síndrome neurodegenerativo heterogéneo de etiología incierta. La mayoría de los casos son esporádicos aunque existen formas familiares de la enfermedad que están asociadas a mutaciones en ciertos genes, algunos con penetrancia incompleta.¹ En Europa, la incidencia oscila entre 2-3 casos por 100.000 personas. Se ha observado que ésta difiere en base a orígenes ancestrales, siendo menor en el este de Asia (0,8 casos por 100.000) y el sur de Asia (0,7 casos por 100.000). En áreas donde poblaciones de ancestros diferentes viven en proximidad (como por ejemplo en la zona norte de América), la tasa de incidencia de ELA en la población indígena es particularmente baja (aproximadamente 0,63 casos por 100.000) mientras que la incidencia en regiones de poblaciones con orígenes ancestrales relativamente homogéneos (como Irlanda, Escocia, Islas Feroe) es más alta (2.6 casos por 100.000).^{2,3} Además, se han reportado variaciones en el fenotipo e historia natural de la enfermedad según estos orígenes ancestrales diferentes, siendo la supervivencia mucho más corta en Europa (24 meses) que en Asia central (48 meses) una vez diagnosticada la enfermedad.⁴ En cualquier caso, el número de pacientes con ELA va en aumento en concordancia con el envejecimiento de la sociedad, ya que la mayoría de los pacientes diagnosticados se sitúan entre los 50 y 75 años de edad.⁵

1.2 DIAGNÓSTICO Y CURSO CLÍNICO

El diagnóstico es clínico, basado en los criterios de El Escorial (**Tabla 1**) y habiendo descartado los diagnósticos diferenciales de enfermedades que mimetizan la ELA y son tratables (**Tabla 2**)⁶. La clínica se puede caracterizar por la degeneración tanto de la primera como de la segunda motoneurona de un modo asimétrico y simultáneo que conduce a síntomas motores y extramotors variables. La primera motoneurona, que conecta el córtex cerebral con el tronco del encéfalo y la médula espinal, es la motoneurona 'inhibidora' y su degeneración produce entre otros síntomas rigidez, hiperreflexia y espasticidad muscular. La segunda motoneurona, que conecta el tronco del encéfalo y la médula espinal con el músculo, es la motoneurona 'activadora' y al degenerarse, se producen atrofia muscular, disminución de los reflejos y fasciculaciones y se registra denervación en el

electromiograma.⁷ Por último, hay que destacar que no haya afectación de los esfínteres y la musculatura estriada, la cual engloba la musculatura extrínseca ocular y la musculatura cardíaca, las cuales mantienen su funcionalidad en la ELA. Además, los pacientes pueden presentar una dramática pérdida de peso inexplicable, que probablemente esté en relación con el estado hipermetabólico descrito recientemente.⁸ Estas evidencias científicas suponen la base de la hipótesis del proyecto que se presenta a continuación, siendo este trabajo la primera parte del proyecto del grupo de enfermedades neurodegenerativas y neuromusculares liderado por el Profesor Adolfo López de Munaín en el Instituto de Investigación Sanitaria Bionostia.

El diagnóstico de ELA requiere:	Categorías de ELA	Deben estar ausentes:	El diagnóstico de ELA se apoya en:
1. Signos de MNS 2. Signos de MNI 3. Curso progresivo	Definida: MNS + MNI en tres regiones. Probable: MNS + MNI en dos regiones (MNS rostral a MNI). Posible: MNS + MNI en una región; MNS en dos o tres regiones (ELP). Sospecha: MNI en dos o tres regiones (AMP).	1. Trastornos sensitivos 2. Disfunción esfinteriana 3. Problemas visuales 4. Trastorno autonómico 5. Enfermedad de Parkinson 6. Enfermedad de Alzheimer 7. Exclusión de otras entidades que mimetizan la ELA	1. Fasciculaciones en una o más regiones 2. EMG con cambios neurogénicos 3. Velocidades de conducción motora y sensitiva normales (latencias distales pueden estar aumentadas) 4. Ausencia de bloqueos de conducción

Regiones: Bulbar, cervical, torácica y lumbosacra.

MNI: Neuronas motoras inferiores

MNS: Neuronas motoras superiores

AMP: Atrofia muscular progresiva

ELP: Esclerosis lateral primaria.

Tabla 1. Criterios de El Escorial.

Síntomas y signos de MNS	Síntomas y signos de MNI	Síntomas y signos de MNS y MNI	Síntomas y signos bulbares
- Mielopatía cervico-artrósica	- Atrofia espinal del adulto	- Mielopatía cervico-artrósica o lumbar	- Malformación de Arnold - Chiari
- Malformación de Arnold-Chiari	- Neuropatía por bloqueos de la conducción	- Siringomielia	- Miastenia gravis
- Paraparesia espástica hereditaria	- Poliomiелitis aguda	- Tumores cervicales espinales. intrínsecos o extrínsecos	- Siringobulbia
- Paraparesia espástica asociada a HTLV-I	- Síndrome post-polio	- Tirotoxicosis	- Enfermedad de Kennedy
- Tumores a nivel de tronco de encéfalo y/o raquídeos	- CIDP	- Hiperparatiroidismo	- Tumores del foramen magnum
- Malformaciones vasculares medulares	- Atrofia focal benigna	- Déficit de vitamina B12	
- Esclerosis múltiple	- Fasciculaciones benignas	- Intoxicación por plomo	
- Adrenomielo-neuropatía	- Enfermedad de Kennedy	- Paraproteinemias	
- Latirismo	- Síndrome paraneoplásico asociado a procesos linfoproliferativos	- Síndrome paraneoplásico	
	- Miopatías inflamatorias o mitocondriales	- Enfermedades infecciosas (lúes. neuroborreliosis, VIH con algunos casos reversibles)	
	- Intoxicación por plomo	- Enfermedad de Machado-Joseph	
	- Déficit de hexosaminidasa A	- Déficit de hexosaminidasa A del adulto	
	- Síndrome post-radioterapia	- Enfermedad por cuerpos de poliglucosanos	
	- Neuralgia amiotrófica	- Síndrome post-electrocución	

HTLV-I: Virus linfotrópico de células T humanas tipo I.

CIDP: Polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica.

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana.

Tabla 2. Diagnósticos diferenciales de ELA

La aparición de la enfermedad puede variar entre pacientes; la mayoría debuta con la forma espinal (70%) que conlleva debilidad muscular en las extremidades de forma asimétrica sin trastornos sensitivos asociados. La segunda en frecuencia, la forma bulbar (25%) se caracteriza por disartria progresiva, seguida de disfagia y a menudo asociada a labilidad emocional. Además, con menor frecuencia la ELA puede presentar un comienzo con fallo respiratorio (5%).⁹

Durante el curso de la enfermedad hasta el 50% de los pacientes desarrollan disfunción cognitiva o conductual (la apatía es muy frecuente) y el 13% presenta demencia frontotemporal (DFT) concomitante.¹⁰⁻¹² Esta alta prevalencia de síntomas cognitivos y/o conductuales se ha asociado a una expansión de repetición de hexanucleótidos en el gen C9orf72 ya que se trata de la principal causa genética de ELA y DFT.^{13,14}

El curso de la ELA es generalmente rápido, causando debilidad y atrofia muscular progresiva y debido a su fisiopatología incierta, no hay tratamientos efectivos disponibles. El cuidado multidisciplinar del paciente está considerado el 'gold standard' durante el desarrollo de la enfermedad. El cuidado multidisciplinar puede reducir las hospitalizaciones agudas y prevenir el rechazo al cuidado.¹⁵ Por otro lado, Riluzol y Edaravone son dos tratamientos actuales aprobados para la ELA. Riluzol, inhibidor de glutamato, prolonga 2-3 meses la supervivencia en el mejor de los casos, con poco efecto en la calidad de vida mientras que Edaravone mejora ligeramente la movilidad del paciente pero su efecto en la supervivencia es desconocido. La mayoría de los pacientes, sobre todo en la forma espinal, muere en 3-5 años desde el inicio de los síntomas a causa de fallo respiratorio. La forma bulbar conlleva un peor pronóstico de 2-3 años.^{5,7} En este sentido, la investigación traslacional y la profundización en el conocimiento clínico-molecular de la enfermedad por tanto, es de especial relevancia en aras de mejorar la calidad de vida de estos pacientes y también de las personas que los rodean. Por lo que descubrir la verdadera fisiopatología de la ELA es de extrema relevancia para asentar las bases de dicha investigación.

1.3 PATOFISIOLOGÍA Y ETIOLOGÍA DE LA ELA

Respecto a la etiología es aún desconocida. El 90% de los casos son esporádicos y el 10% genéticos provocados por diferentes mutaciones en genes conocidos. Sin embargo, se estima que la combinación de la genética con la exposición a varios factores ambientales es necesaria para desencadenar la enfermedad y se ha resaltado en varios estudios el rol del medio ambiente en su patogénesis. Las mutaciones que causan la aparición de “ELA familiar” son raras (en contraste con otras enfermedades, como la esquizofrenia, que se asocian a un gran número de variantes comunes) e interaccionan con factores ambientales. Notablemente, un estudio poblacional reciente¹⁶ estima mediante un modelo matemático que la esclerosis lateral amiotrófica es resultado de un proceso de 5-6 pasos siendo éstos resultado de la combinación de factores genéticos y ambientales para desencadenar la enfermedad. Este modelo establece que los 5 pasos posteriores (genéticos y / o ambientales) determinarían la edad de inicio, la gravedad de los síntomas y la variabilidad de las manifestaciones clínicas y el modelo resulta ser válido tanto para los casos esporádicos como para los familiares.

Se conocen al menos 30 genes que confieren mayor riesgo de padecer ELA. La evidencia sugiere un rol de herencia oligogenética (en la cual más de un gen determinan un fenotipo) y de pleiotropía genética (en la cual un sólo gen puede reproducir múltiples fenotipos). En población europea, hasta el 20% de pacientes con ELA tienen historia familiar de ELA o DFT y hay 4 genes involucrados en el 70% de los casos familiares: C9orf72, TARDBP (el gen que se transcribe a la proteína TDP43), SOD1 and FUS.¹⁷ Sin embargo, incluso en el caso de estos genes conocidos de herencia mendeliana, las formas familiares suelen tener menos del 50% de penetrancia y pleiotropía genética, con evidencia de herencia oligogenética y poligenética en individuos con enfermedad aparentemente esporádica.^{18,19}

Respecto a los factores ambientales, la exposición a los metales pesados (mercurio, selenio y plomo) tanto en cantidades insuficientes como en sus niveles tóxicos podrían ser un factor predisponente de ELA y también la exposición a los pesticidas, que entre sus componentes se encuentran los organofosforados que inhiben irreversiblemente la AChE induciendo la excitotoxicidad y el daño cerebral como posibles inductores de la enfermedad.²⁰

Algunos estudios de casos y controles realizados en regiones de alta incidencia de ELA (como Guam y la península Kii de Japón) han sugerido el papel de las cianotoxinas contenidas en las semillas de cycas (incluyendo β -metilamino-L-alanina),²¹ al igual que la exposición a agua que alberga proliferaciones de cianobacterias.²² Apoyando esta hipótesis, se han encontrado moléculas de β -metilamino-L-alanina en el cerebro de personas con ELA en su estudio postmortem, y no en los controles.²³

En cuanto al estilo de vida, la ELA se presenta con mayor frecuencia entre atletas en comparación con la población general. Por consiguiente, la actividad física intensa y vigorosa podría estar asociada a la enfermedad como factor de riesgo, ya que en los estudios de cohortes los profesionales del deporte como triatletas, futbolistas, esquiadores de fondo etc. se encuentran más presentes en los grupos que desarrollan ELA²⁴, mientras que el ejercicio moderado podría ser protector^{25,26}.

Otras posibles variables identificadas en estudios de casos y controles son el tabaco como factor de riesgo y diabetes mellitus tipo 2, dislipemia y anticonceptivos orales como factores de protección, lo que nos conduce a pensar que el balance energético negativo, es decir, mayor gasto de energía que producción podría ser una de las claves en cuanto a la etiología de la ELA.^{20,27} Respecto al tabaco y sus componentes, el cadmio, el mercurio, los residuos de pesticidas y el formaldehído son los elementos más tóxicos. Actualmente, existen

evidencias que apoyan el papel del cadmio en la neurodegeneración, por su comportamiento como inhibidor de la actividad enzimática Cu/Zn SOD1.²⁸

1.4 FACTORES DE RIESGO GENÉTICOS PARA PADECER ELA

Como se ha mencionado anteriormente, se han descrito unos 30 genes relacionados con la ELA, de los cuales 4 son los más relevantes en la ELA familiar, ordenados de mayor frecuencia a menor: C9ORF72, SOD1, TARDBP y FUS. Las proteínas codificadas por estos genes cumplen diferentes funciones como el procesamiento del ADN/ARN, el transporte vesicular, la autofagia, la organización del citoesqueleto, la apoptosis, la integridad mitocondrial o la regulación del metabolismo energético (**Tabla 3**).

Locus del gen	Gen (proteína)	Herencia	Mecanismos implicados en la ELA
ALS1	SOD1 (Superóxido dismutasa 1)	AD/AR	Estrés oxidativo
ALS2	ALS2 (Alsin)	AR	Transporte vesicular
ALS3	Desconocido	AD	Desconocido
ALS4	SETX (Senataxina)	AD	Metabolismo del ARN
ALS5	Desconocido	AR	Reparación del daño del ADN, crecimiento axonal
ALS6	FUS/TLS (Fusionado en sarcoma/Traducido en liposarcoma)	AD/AR	Metabolismo del ARN
ALS7	Desconocido	AD	Desconocido
ALS8	VAPB (Proteína de membrana asociada a vesícula, VAMP)	AD	Estrés de retículo endoplasmático
ALS9	ANG (Angiogenina)	AD	Metabolismo del ARN
ALS10	TARDBP (Proteína fijadora de ADN TAR)	AD	Metabolismo del ARN
ALS11	FIG4 (Inositol Polifosfato 5- fosfatasa)	AD	Transporte vesicular
ALS12	OPTN (Optineurina)	AD/AR	Autofagia
ALS13	ATXN2 (Ataxina 2)	AD	Metabolismo del ARN
ALS14	VCP (Proteína que contiene Valosina)	AD	Autofagia
ALS15	UBQLN2 (Ubiquilina 2)	XD	Autofagia
ALS16	SIGMAR1 (Receptor intracelular no-opioide sigma 1)	AD	Autofagia
ALS17	CHMP2B (Proteína CMH 2B)	AD	Transporte vesicular
ALS18	PFN1 (Profilina 1)	AD	Citoesqueleto
ALS19	ERBB4 (V-erb-b2 aviar eritroblástica leucemia viral oncogen homólogo 4)	AD	Desarrollo neuronal
ALS20	HNRNPA1 (ribonucleoproteína nuclear heterogénea A1)	AD	Metabolismo del ARN
ALS21	MATR3 (Matrin 3)	AD	Metabolismo del ARN
ALS22	TUBA4A (Tubulina alfa-4A)	AD	Citoesqueleto
ALS-FTD1	C9orf72 (Marco 72 de apertura de lectura en el cromosoma 9)	AD	Metabolismo del ARN, Autofagia
ALS-FTD2	CHCHD10 (proteína CHCHD10)	AD	Mantenimiento mitocondrial

ALS-FTD3	SQSTM1 (Sequestosoma 1)	AD	Autofagia
ALS-FTD4	TBK1 (Quinasa fijadora de TANK 1)	-	Desconocido

Tabla 3. Genes implicados en la ELA.

AD: Autosómico Dominante

AR: Autosómico Recesivo

XD: Ligada al X Dominante

Dentro de todos los genes descritos los más frecuentes son los siguientes:

- SOD1

El Superóxido dismutasa-1 fue el primer gen implicado en la ELA familiar. Codifica para una proteína mitocondrial con el mismo nombre. La enzima SOD1 se une a las moléculas de cobre y zinc para descomponer los ROS, participando de esta manera en los procesos de estrés oxidativo. A nivel celular, su función es regular el consumo de la glucosa y el metabolismo de lípidos y carbohidratos. Un estudio encontró que la eliminación de SOD1 conduce a una disminución de la producción de glucosa en el hígado y al almacenamiento de glucógeno, y a un aumento de los perfiles de lípidos hepáticos en ratones adultos. La ausencia de SOD1 se asoció a su vez a una tolerancia alterada de la glucosa y a un deterioro de la función y pérdida de volumen de las células beta, así como a niveles reducidos de triglicéridos en plasma, niveles aumentados de glucagón y a la disminución de la masa grasa^{29,30}.

Se han descubierto al menos 200 mutaciones en el gen SOD1 que pueden causar la ELA. Aproximadamente la mitad de todos los estadounidenses con ELA causada por mutaciones en el gen SOD1 tienen una mutación particular: G93A. La ELA causada por la mutación A5V generalmente se asocia a una esperanza de vida más corta en comparación con la ELA causada por otras mutaciones genéticas. No está claro por qué las motoneuronas son particularmente sensibles a las mutaciones del gen SOD1, aunque se han descrito varias posibilidades: un aumento de radicales superóxido nocivos, una mayor producción de otros tipos de radicales tóxicos, un aumento de la muerte celular o la acumulación de agregados de la proteína SOD1 mal plegada que puede ser tóxica para las células.³¹

- TARDBP

Mutaciones en el gen TARDBP, que codifica para la proteína TDP-43, y los depósitos de esta proteína se han relacionado con las manifestaciones patológicas de ELA. TDP-43 es una proteína con diversas funciones. Participa tanto en el procesamiento del ADN/ARN como en la apoptosis celular, en la integridad mitocondrial y en el metabolismo de lípidos y carbohidratos.^{32,33} Se han descrito al menos 60 mutaciones en este gen TARDBP que puedan causar la ELA. Los cambios en la proteína TDP-43 hacen que la proteína se pliegue erróneamente y forme agregados en las neuronas motoras. Se ha descrito en un reciente estudio que el TDP-43 está especialmente relacionado con la activación del AMPK, por lo cual estaría de la misma manera implicado en el consumo de la glucosa a nivel muscular durante el ejercicio.³⁴ Además, los análisis histológicos han revelado la presencia de TDP43 insoluble tanto en tejido neuronal como en glía, sugiriendo que diferentes tipos de células pueden también contribuir al proceso neurodegenerativo observado en la ELA. Basado en este principio, se ha propuesto que las perturbaciones en las interacciones neurona-glía o neurona-músculo podrían conducir a la neurodegeneración por diferentes mecanismos aún desconocidos.³⁵

Por otro lado, algunas personas con ELA causada por mutaciones en el gen TARDBP también desarrollan demencia frontotemporal (FTD) pero no está claro por qué algunas personas con mutaciones en este gen desarrollan FTD y otras no.³⁶

- FUS

Participa en muchos de los pasos para la producción de proteínas a nivel del núcleo celular. Se ha descubierto que al menos 85 mutaciones en el gen FUS causan Esclerosis Lateral Amiotrófica. Estas mutaciones pueden interferir en el transporte de ARNm fuera del núcleo de las células. Como resultado, la proteína FUS y el ARNm quedan atrapados dentro de las células y es probable que formen agregados. Las personas con ELA causada por mutaciones en el gen FUS tienden a desarrollar la enfermedad a una edad más temprana y tienen una esperanza de vida menor en comparación con las personas que tienen ELA esporádica o ELA causada por mutaciones en otros genes.

- C9ORF72

El gen C9ORF72 codifica para la proteína C9ORF72, cuya localización se cree que es la región presináptica de la neurona. El gen contiene un segmento de ADN formado por una serie de seis nucleótidos, GGGGCC, y se ha visto que la expansión de la repetición de este hexanucleótido superior a 30 podría ser causa de la ELA.³⁷ Las interrupciones en la función de la proteína C9ORF72 pueden conducir a la muerte prematura de la neurona motora, lo que daría como resultado los signos y síntomas de la ELA. Sin embargo, se ha visto que a pesar de que se trate de la mutación familiar más frecuente, individuos con esa expresión expansiva no presentan fenotipo ELA ni DFT, con lo que no está del todo claro si es una causa directa o uno de los varios factores genéticos que están actuando comúnmente en el desarrollo de esta patología.³⁸

Además de estos, en la ELA se describen otros genes menores o de susceptibilidad cuya alteración podría estar involucrada en la causa de la enfermedad. El gen OPTN, por ejemplo, que participa en la autofagia y en el transporte vesicular; EWSR y TAF-15 relacionados con el metabolismo del ARN; el PFN1 implicada en la organización del citoesqueleto o más raramente conocidos como el ALS2, SIGMAR1, SETX, etc., pueden tener cierta relación con la ELA.

Hasta la fecha, estas alteraciones genéticas se consideran una de las causas directas de la patogenia primaria que es la neurodegeneración y muerte de la motoneurona, que en resumen sería mayoritariamente por los depósitos de TDP-43 tanto en formas esporádicas como familiares con alguna excepción (depósitos de FUS).

1.5 FACTORES DE RIESGO AMBIENTALES DE LA ELA: LA ELA COMO ENFERMEDAD METABÓLICA

Existen crecientes evidencias a favor de la existencia de una alteración metabólica periférica en muchos casos de ELA (fundamentalmente esporádicos), que se localizaría a nivel de la fibra muscular o la unión neuromuscular. Que esta alteración metabólica preceda al daño neuronal es algo que queda por demostrar. Algunas de las evidencias que reflejan un deterioro en la homeostasis energética son las siguientes:

-Pérdida de masa muscular y grasa subcutánea.³⁹

- Hígado graso en 76% de pacientes con ELA en una cohorte japonesa.⁴⁰
- Elevado consumo de O₂ e hipercatabolismo.^{41,42}
- Deficiencias en la utilización de glucosa y beta oxidación de ácidos grasos.^{43,44}
- Modelos animales con déficit de energía, descenso de las reservas energéticas, aumento de consumo de lípidos por el músculo esquelético.⁴⁵

Este estado hipercatabólico podría jugar un papel central en la enfermedad. Así, un consumo excesivo de energía o de un déficit intrínseco en la producción de la misma, podría generar mecanismos alternativos de combustión con producción de metabolitos intermedios que en un determinado contexto de detoxificación insuficiente conducirían a daño neuronal y posteriormente a la neurodegeneración.

1.6 DROSOPHILA MELANOGASTER COMO MODELO IN-VIVO PARA EL ESTUDIO DE LA ELA.

El uso de *D. melanogaster* en la investigación científica abarca más de 100 años y es muy variado.^{46,47} El concepto de que los rasgos hereditarios son transportados en los cromosomas fue desarrollado por primera vez en la mosca y fue el primer organismo complejo en tener secuenciado todo su genoma (poco más de 14.000 genes repartidos en 3 cromosomas principalmente aunque posea 4). Tras la secuencia del genoma humano, las homologías observadas entre ambos genomas fortaleció su rol como modelo para entender la fisiopatología humana⁴⁶.

Las enfermedades neurodegenerativas se producen por una pérdida progresiva de neuronas en regiones específicas. Están asociadas a la edad y presentan ciertas similitudes clínicas y patológicas. Un gran número de enfermedades neurodegenerativas están asociadas a la formación de agregados intracelulares de proteínas que resultan ser tóxicas para la célula (como en la enfermedad de Alzheimer los agregados de proteína beta-amiloide y tau, las inclusiones de tdp43 en ELA y DFT o alpha-sinucleína en Parkinson)⁴⁶. La identificación de mutaciones asociadas a estas enfermedades ha permitido la creación de herramientas en forma de modelos *in-vitro* e *in-vivo* para determinar la función y/o los efectos moleculares que producen y han ayudado en el avance del conocimiento de estas enfermedades. Se ha descrito por ejemplo, que algunas proteínas presentan tendencia a plegarse

inadecuadamente, formar agregados y provocar neurotoxicidad. Tras la identificación de mutaciones en genes causantes de la enfermedad, es necesario abordar su integración en la fisiopatología del paciente que generalmente es compleja y lleva a los síntomas clínicos y progresión. Además, existen limitaciones éticas y técnicas para llevar a cabo análisis en pacientes y la mayoría de las investigaciones usan tejidos postmortem, los cuales no reflejan los eventos patológicos precoces del estado presintomático. Por tanto, los modelos animales, y en especial *D. melanogaster*, son alternativas excelentes para estudiar los mecanismos moleculares de estas enfermedades desde el inicio temprano hasta las etapas terminales, así como posibles tratamientos.⁴⁶

Algunas de las ventajas de este modelo son las siguientes:

- Se ha estimado que **alrededor del 75% de los genes relacionados con enfermedades en humanos tienen su homólogo funcional en la mosca**. La identidad de nucleótidos o secuencias proteicas entre homólogos *Drosophila*-Humano suele ser aproximadamente del 40%; pero cabe destacar que este aparentemente no tan elevado porcentaje de similitud se traduce en homologías del 80-90% en dominios funcionales de las proteínas.^{46,47}
- El genoma de la mosca es de **poca redundancia y prácticamente todos sus genes pueden ser objeto de manipulación**. Sólo uno o unos pocos genes codifican para los miembros de una clase de proteínas, a diferencia de organismos mayores que tienden a tener más genes codificando para proteínas altamente relacionadas, lo cual muestra a menudo redundancia funcional y complica los análisis de pérdida de función.⁴⁷
- **La mosca tiene un ciclo de vida corto**. Un apareamiento exitoso puede producir cientos de crías en 10-12 días a 25°C.^{46,47}
- Además **puede modelar diferentes etapas del desarrollo**: embrión, larva, pupa y adulta. **La mosca adulta es un organismo complejo y sofisticado**: tiene estructuras que desempeñan funciones equivalentes a las del corazón, pulmón, riñón, intestino y aparato reproductor de los mamíferos. Su cerebro tiene unas 300.000 neuronas creando circuitos neuronales complejos para regular el ritmo circadiano, sueño, aprendizaje y memoria, alimentación, cortejo, agresividad y conducción del vuelo. Se ha comprobado que responde a ciertos fármacos que actúan en el SNC de una manera similar a los mamíferos.⁴⁶

- **Es fácil y coste-efectivo generar un animal transgénico.** Esencialmente, el cDNA/RNAi u otro elemento genético de interés es clonado en una región de plásmido de ADN entre dos elementos repetidos inversamente (los elementos P son los más comunes) y junto con un helper que expresa una transposasa, el plásmido es inyectado en las células germinales posteriores de los embriones de mosca. Esto conlleva tan sólo un par de horas y de 100 embriones, del 10 al 15% resultarán en una línea germinal con integración exitosa y se visualizará por un marcador fenotípico en la generación F2. Una vez construido el plásmido transgénico, la inyección y selección de las líneas de interés tarda 6 semanas aproximadamente. Pero hay varias casas comerciales que realizan por menos de \$300 todo el procedimiento.^{46,47}

Sin embargo, hay que ser conscientes de las limitaciones de este modelo. Primero, tiene un sistema inmune mucho más simple que los mamíferos, que consta de respuesta innata pero carece de respuesta inmune adaptativa, por lo que puede no ser un modelo apropiado para el estudio de patologías autoinmunes. Segundo, hay diferencias anatómicas significantes entre el cerebro de la mosca y el humano. Por ejemplo, su cerebro no tiene sustancia negra. Para concluir y como idea general, en un proceso celular concreto como las vías de señalización o la disfunción de un gen o proteína que causa una enfermedad, el modelo de mosca puede tener alto grado de conservación y validez. Pero para que *D. melanogaster* sea un modelo informativo en ciencia, es imprescindible tener una hipótesis bien definida que facilite la traslación de los resultados a humanos.⁴⁶

La ELA no tiene tratamientos efectivos que mejoren la calidad de vida de los pacientes. Para encontrar nuevas dianas terapéuticas es crucial avanzar en el conocimiento molecular y etiología de la enfermedad. Este ambicioso proyecto intentará esclarecer el origen primario de la enfermedad para delimitar la causa de la enfermedad y sugerir posibles nuevas terapias. Para ello, se deben abordar muchos hitos importantes intermedios; son algunos de estos hitos los que se abordan en el siguiente trabajo fin de grado.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Los genes TARDBP y FUS podrían participar en la regulación de la fisiología de la motoneurona y la unión neuromuscular. Nuestro objetivo es conseguir un modelo de

Drosophila melanogaster con silenciamiento tejido específico de genes ortólogos de TARDBP y FUS. Éste es un modelo *in-vivo* novedoso que podría reflejar los principales eventos patológicos de la enfermedad en humanos. Por lo que podrá ser utilizado como modelo *in-vivo* de ELA con la finalidad de medir el efecto de estos silenciamiento en los diferentes tipos celulares (músculo, glía, motoneurona) integrantes de la unión neuromuscular. El objetivo final será identificar en cual o cuales podría encontrarse el desencadenante primario de la degeneración de la motoneurona y el efecto que podría provocar en los demás.

La hipótesis expuesta dará lugar a los siguientes objetivos concretos:

1-Por un lado, vamos a realizar varios cruces de mosca hasta conseguir el silenciamiento de TBPH y CAZ (es decir, los genes con función homóloga en mosca de TARDBP y FUS respectivamente) en glía y en músculo.

2-Por otro lado, queremos detectar diferencias en el fenotipo locomotor de las moscas con silenciamiento de los genes causante de ELA en músculo.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 MANTENIMIENTO DEL MODELO *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Los stocks de mosca se han guardado en tubos de plástico que contienen comida en la base (cuyos ingredientes son agar 6 g/l, levadura 62.5 g/l, azúcar 41.6 g/l, harina de maíz 29 g/l, ácido propiónico 4.1 ml/l) y un tapón de algodón y se han transferido a tubos nuevos para su mantenimiento. Estos tubos se han almacenado en bandejas de plástico que se han guardado en una cámara a 23°C, humedad de 70%rh y 50% de luz (**Figura 1**). El control de la temperatura ha sido estricto ya que la temperatura influye en el tiempo de desarrollo de las moscas.⁴⁷ Los tubos con alimento para mosca se han conservado previamente en una cámara a 4°C.

Para la manipulación y selección de machos y vírgenes de los fenotipos deseados, hemos utilizado bombonas de CO₂ comprimido a alta presión y una bandeja de extensión sobre la que se han inmovilizado las moscas (es una bandeja que dispensa CO₂ a través de unos poros y las duerme), se han visualizado por el microscopio y luego se han transferido a nuevos tubos con la ayuda de un pincel o desechado a un bote de lejía (**Figura 1**).

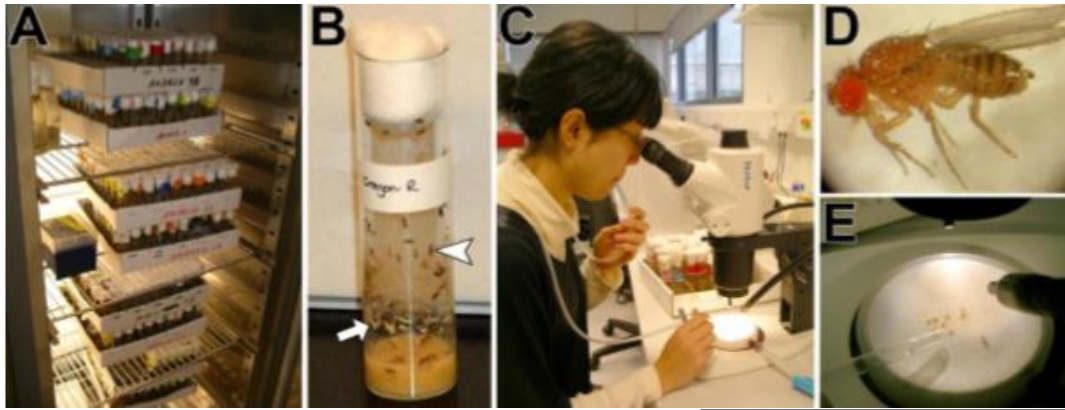


Figura 1. Materiales.

A: Bandejas en la cámara a 23°C

B: Tubo con comida en la base

C-E: Manipulación de las moscas

Los genotipos necesitados para los cruces se han conseguido de The Bloomington Drosophila Stock Center de la Universidad de Indiana que es un centro público de stock de *D. melanogaster* para investigación. Todos los constructos utilizados fueron clonados con EcoRI-XbaI en el plásmido pUASTattB (5xUAS, GenBank: EF362409). Es decir, se ha usado el sistema repo-GAL4 para la expresión de RNA interferente (RNAi) contra TBPH en tejidos específicos. Las moscas transgénicas fueron generadas por inyección embrionaria standard (Best Gene Inc.) a través del sistema transgénico integrasa PhiC31mediado. Concretamente se ha realizado el siguiente pedido al centro:

- 9356: Genotipo de los cuatro marcadores (W1118)2; Wgsp/cyo; Ki/TM6BTb1
- 7415: Genotipo de REPO (W1118)2; (+)2; REPO/TM3sb
- 24650: Genotipo DICER2 (W1118)2; (DCR2)2; (+)2
- 38379: Genotipo TBPH9 (+)2; (TBPH9 iRNA)2; (+)2
- 104401: Genotipo TBPH401 (+)2; (TBPH401 iRNA)2; (+)2
- 100291: Genotipo CAZ (+)2; (Caz iRNA)2; (+)2
- 39014: Genotipo TBPHBloomington (+)2; (TBPHB iRNA)/Cyo; (+)2
- 25756: Genotipo control (DCR2)2; (+)2; (MEF2)2

Los diferentes genotipos de TBPH (9, 401 y Bloomington) son modelos de mosca que expresan RNA interferentes de diferentes locus del gen TBPH, de manera que cada subtipo produce el silenciamiento en un locus diferente del gen. Por eso los efectos pueden diferir y el silenciamiento puede resultar más efectivo en algunos subtipos que en otros. Otros subtipos son modelos en los que el mecanismo utilizado para silenciar varía. Por ejemplo, los locus en los que interfieren TBPH9 y TBPH Bloomington son diferentes pero TBPH9 y TBPH401 silencian el mismo locus, solo que lo hacen con mecanismos distintos y TBPH401 ha demostrado un silenciamiento mayor.

3.2 LA TÉCNICA DE SILENCIAMIENTO EN MOSCA

El sistema GAL4/UAS es primordial para los modelos transgénicos de mosca, desarrollado por Brand y Perrimon en 1993. Por un lado, el promotor para la expresión de un gen particular del factor de transcripción GAL4 en tejidos definidos. Por otro lado, elementos de respuesta al GAL4, es decir, UAS y el elemento transgénico deseado. Cuando las dos cadenas se unen, el transgén se expresa en los tejidos específicos definidos por el elemento promotor GAL4.⁴⁶

El silenciamiento de un gen se puede llevar a cabo en la transcripción (por ejemplo, una molécula RNA homóloga al promotor del gen que silencia mediante metilación o silenciamiento dependiente de Polycomb en el cual secuencias no homólogas se silencian mutuamente por medio de puentes endógenos) o post-transcripción (por ejemplo, acumulando RNA pequeño interferente, RNAsi o con el agente activo en la técnica de RNA interferente, es decir, RNA de doble cadena, dsRNA).⁴⁸

Nuestras moscas transgénicas se han conseguido mediante la técnica de RNA interferente, RNAi. En esta técnica, un elemento transgénico que es un RNAds específico está dirigido a la degradación del RNAm del gen que se quiere suprimir. Por otro lado, el sistema GAL4/UAS hará que el RNAi se transcriba en las células de tejidos definidos. Este RNAi, más concretamente un RNAds, se unirá al RNAm (por poseer nucleótidos complementarios) del gen mencionado provocando su degradación (el complejo RNAi y RNAm se degrada) y por consiguiente, suprimiendo su expresión celular en los tejidos definidos.⁴⁸

Se han desarrollado muchas modificaciones y mejoras en este sistema en cuanto a especificidad tisular y especificidad de expresión temporal y en el *Vienna Drosophila Research Center* han creado una colección de cadenas de UAS-RNAi dirigidas al 90% de todo el genoma de la mosca, disponibles para la comunidad científica para crear modelos de enfermedades humanas por medio de mutaciones o inactivación de los genes con función homóloga en mosca (como es nuestro caso) o los mismos genes y proteínas que producen enfermedades humanas.⁴⁶

La encima Dicer es una ribonucleasa III que tiene un dominio de RNA helicasa DEXH-box N-terminal, un dominio de función desconocida (DUF283), un dominio PAZ, dos dominios

de ribonucleasas (RIIIa y RIIIb) y un dominio de unión al RNAs. Por lo cual, actúa sobre el RNAs y lo degrada en pequeños RNAs de 21-23nt (de doble cadena) y estos los entrega al complejo RISC. La disminución de Dicer inhibe la producción de RNAsi y por consiguiente, todo el mecanismo de RNAi. Los homólogos de Dicer se encuentran en todos los sistemas biológicos donde funciona el RNAi (levaduras, ratones, humanos...). *Drosophila* tiene dos isoformas dicer: dcr-1 y dcr-2. El dcr-1 juega un papel importante en la biogénesis de RNAsi y el dcr-2 está involucrado en la producción de RNAsi, aunque pueden solaparse sus funciones. De este RNAsi, una de sus cadenas se incorpora en el complejo RISC activo para partir el RNAm diana, mientras que la otra cadena es degradada.⁴⁸ (Figura 2)

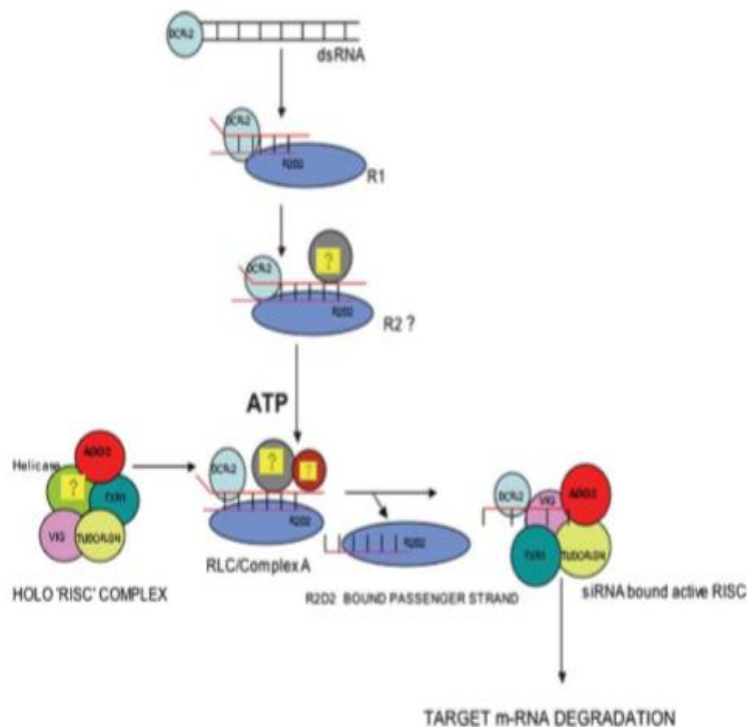


Figura 2. Complejo RISC e integrantes.

La degradación de ARNs en la célula por DCR2 resulta en ARNs de 21-23nt. Sólo una cadena del dúplex ARNs entrará a la vía del RNAi y la otra cadena, "la pasajera", será degradada. DCR2 y R2D2 forman el heterodímero que reconoce la asimetría termodinámica en el dúplex ARNs. La cadena que es termodinámicamente inestable forma "la cadena guía" y es parte del complejo RISC. El dúplex ARNs ligado a DCR2/R2D2 constituye el complejo R1 que forma el complejo transitorio R2 y entonces, este es activado por ATP para formar el RLC (RISC Loading Complex o Complejo A). Se ha visto que AGO2 se intercambia con R2D2 y la cadena pasajera ligada al R2D2 es destruida. El complejo RISC activo contiene una única cadena de ARNs unida a AGO2, VIG, TSN y dFXR1.

Dentro de la familia de proteínas de argonauta se encuentra la argonauta-2 (AGO-2) que en *Drosophila* juega una función principal en el mecanismo del RNAi porque gracias a sus diferentes dominios ocasiona la interacción proteína-proteína entre el RNAsi, el complejo RISC y Dicer-2.⁴⁸

RISC es un complejo multiproteico del rango de 200-500kDa que produce la degradación del RNAm diana. Sus diferentes componentes ayudan al montaje del complejo activo y a cargar el RNAsi guía de una sola cadena (competente para la degradación deseada). Una vez cargado y activo, este complejo necesita Mg^{2+} para su actividad catalítica.⁴⁸

La evidencia bioquímica indica que RISC es una endonucleasa cuyos productos tienen un grupo 5'-fosfomonoéster y otro 3'-hidróxilo. RISC corta el RNA diana en el grupo fosfato, el cual ha resultado ser base par del undécimo o duodécimo nucleótido empezando por el cabo 5' del RNAsi guía (*antisense*). La sustitución de un grupo 2'-hidróxilo por uno deóxido en la misma posición no afecta la catálisis de RISC. Por otro lado, la sustitución en el cabo 2' de la ribosa por un grupo metilo o fosforotiato sí que afecta a la catálisis, lo cual subraya la importancia de las uniones ésteres como impedimento para la función de este complejo.⁴⁸

Como ya se ha mencionado, Dicer-2 produce RNAsi de 21-23nt y doble cadena. Solo una de las cadenas está asociada con el complejo RISC activo. El heterodímero Dcr2/R2D2 detecta la asimetría en el dúplex RNAsi. El R2D2 es capaz de unirse al RNAsi producido por Dcr-2 gracias a sus dos dominios destinados a ello y así el heterodímero Dcr2/R2D2 estabiliza cada componente incluyendo el RNAsi que emerge y se entrega al complejo RISC. La cadena de RNAsi referida como “la cadena guía” que es de termodinámica inestable se suma a dicho complejo y la otra, “la cadena pasajera”, estable termodinámicamente, se degrada. Por último, mencionar que para la formación de RLC (RISC Loading Complex) o complejo A se consume ATP y el complejo RISC activo, también llamado holoRISC, contiene la cadena guía del RNAsi que interacciona con el dominio PAZ de AGO-2. En este punto, ya es competente para la degradación del RNAm específico en el citoplasma (en unos cuerpos citoplasmáticos).⁴⁸

Para concluir y en términos generales, la maquinaria de RNAi sirve para eliminar el RNA aberrante en la célula. Este podría originarse de fuentes exteriores como virus, de secuencias repetidas en el genoma o de RNAm aberrante. El microRNA sirve para modular la

traducción de RNAm específico durante el desarrollo. Y entre otras funciones de los RNAs pequeños se incluyen su implicación en las modificaciones de cromatina para el silenciamiento o expresión de secuencias específicas, en varias regiones del cromosoma (centrómero, heterocromatina y telómeros) y también su implicación en algunos casos de silenciamiento Polycomb. Por lo que establecen la estructura del cromosoma y su función, más allá de la defensa genómica contra virus y elementos transponibles.⁴⁸

3.3 OBTENCIÓN DEL MODELO CON SILENCIAMIENTO DE TBPH Y CAZ EN GLÍA Y EN MÚSCULO

3.3.1 Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*

Las hembras fecundadas almacenan esperma en su *receptaculum seminis* para la fertilización de cientos de huevos que pondrán durante varios días. A 25°C el desarrollo embrionario dura 21 horas aproximadamente. Las larvas recién nacidas (1ª) necesitan 2 días para mudar a las etapas 2ª y 3ª. La larva de 3ª etapa continúa alimentándose durante un día más (etapa de búsqueda de alimento) antes de abandonar su fuente de alimentación y migrar (etapa deambulante) y finalmente convertirse en prepupa y después pupa. Durante el período de pupa, se generan todos los órganos (histólisis) y se reestructura a su forma adulta (metamorfosis). 10 días después de la puesta de huevos, las moscas adultas emergen de la carcasa de la pupa (**Figura 3**). Entonces, los machos requerirán hasta 8 horas para madurar sexualmente, lo cual es de gran utilidad para recolectar hembras vírgenes. También mencionar que los tiempos descritos se duplican cuando las moscas crecen a 18°C.⁴⁷

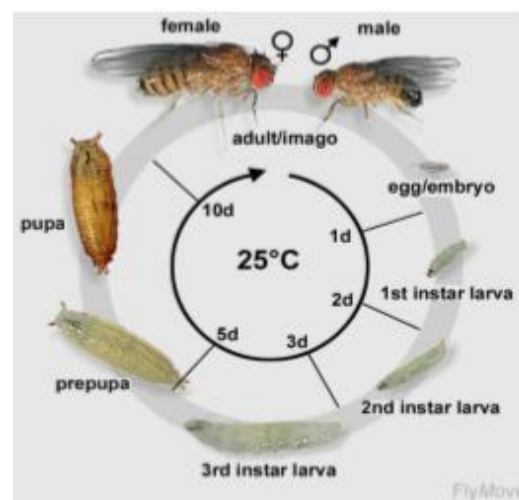


Figura 3. Ciclo de vida de *Drosophila*.

3.3.2 Esquemas de apareamiento

Para la técnica y la experimentación es necesario realizar cruces genéticos clásicos. En estos cruces, hemos usado las moscas del pedido ya mencionado y calculado qué genes aparecerían en las generaciones sucesivas según esquemas de apareamiento. Los marcadores fenotípicos son indispensables para manipular y visualizar las diferentes opciones genéticas con la finalidad de conseguir el modelo de mosca al que aspiramos.

Primero es necesario separar y recolectar hembras vírgenes y machos (**Figura 4**). Para su distinción se precisa conocer que los machos son de menor tamaño y poseen una pequeña cresta en sus primeras patas delanteras y en el dorso las hembras son claras a rayas y los machos poseen la parte caudal más oscura. Pero es sobretodo distintivo que colocadas ventralmente los machos muestran un aro negro alrededor del ano.⁴⁷

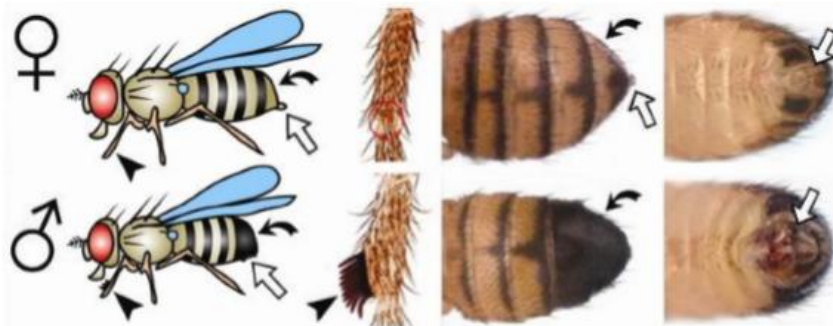


Figura 4. Rasgos distintivos de hembras y machos.

Segundo, las hembras deben ser vírgenes y seleccionarlas antes de que copulen y sean fecundadas. Para ello se deja el cruce 1 semana para que las moscas adultas se apareen y las hembras pongan huevos. Una vez que comienzan a aparecer larvas, se eliminan todas las moscas adultas de esos tubos (se traspasan a tubos nuevos para que sigan cruzándose y el proceso se repite) y se espera al nacimiento de las larvas para la selección de hembras vírgenes y machos. Las hembras vírgenes se reconocen por la expulsión de meconio y aspecto de recién nacidas (alas replegadas) y una mancha verdosa oscura a un lado del abdomen, la cual es visible durante unas pocas horas tras el nacimiento (el período de 5-8

horas que los machos son inmaduros sexualmente) y es un indicador seguro de la virginidad femenina (**Figura 5**).⁴⁷

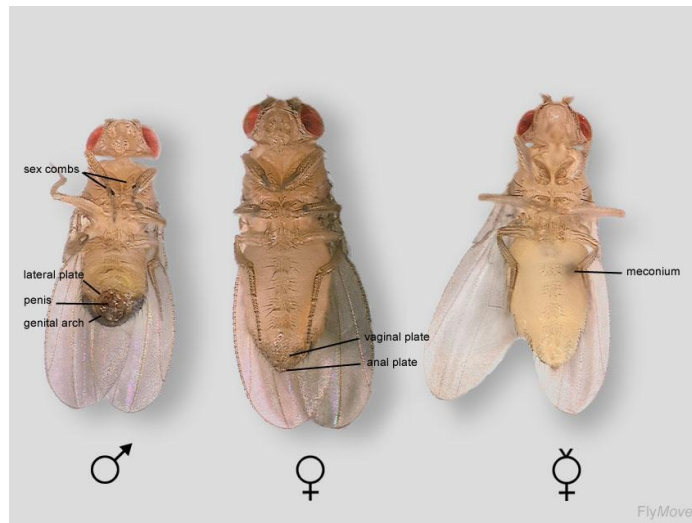


Figura 5. Rasgos distintivos de macho, hembra y hembra virgen.

Tercero las moscas son seleccionadas por los marcadores fenotípicos, según el esquema de cruces. Al diseñar el esquema de cruces, se ha tenido en cuenta que la combinación de marcadores permitieran reconocer el genotipo correcto y único inequívocamente en ambos sexos y en cada paso del esquema. Hay muchas características fenotípicas que se usan como marcadores en los cruces: la largura y posición del pelo, el tamaño y la forma de los ojos y alas y el patrón de las venas alares.⁴⁷ En la **Figura 6** se resumen los diferentes marcadores y en qué cromosoma se encuentra cada uno.

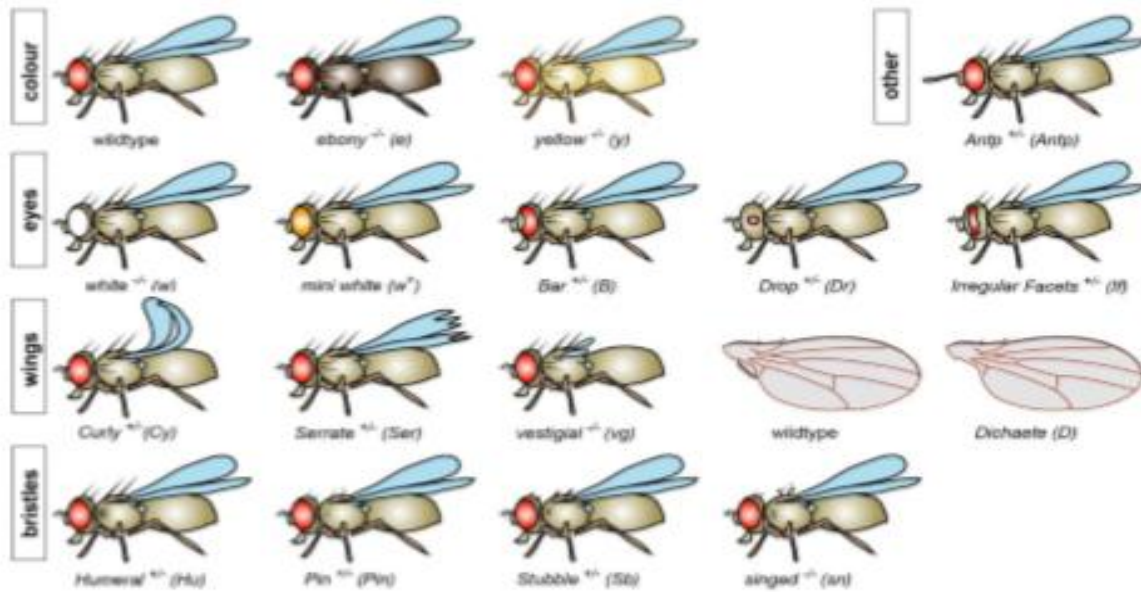


Figura 6. Ejemplos de mutaciones marcadoras típicas. Color del cuerpo, marcadores oculares, marcadores alares, marcadores del pelo y otros. En orden alfabético:

Antennapedia (dominante, 3º cromosoma, transformación antena-pierna)

Bar (dominante, 1º, ojos con forma de riñón en heterocigosis, ojos hendidos en homo/hemicigosis)

Curly (dominante, 2º, alas curvas hacia arriba)

Drop (dominante, 3º, pequeños ojos con forma de gota)

Ebony (recesivo, 3º, color oscuro corporal)

Humeral (dominante, 3º, mayor número de pelo humeral)

Irregular Facets (dominante, 2º, ojos hendidos)

Mini-white (dominante en mutante blanco, recesivo en wildtype, cualquier cromosoma, alelo hipomórfico comúnmente usado como marcador de elementos transponibles)

Pin (dominante, 2º, pelo corto punteado)

Serrate (dominante, 3º, puntas de las alas serradas)

Singed (recesivo, 1º, pelo rizado)

Stubble (dominante, 3º, pelo corto romo)

Vestigial (recesivo, 2º, alas reducidas)

White (recesivo, 1º, ojos blancos)

Yellow (recesivo, 1º, cuerpo amarillento)

En general, se han utilizado más hembras que machos en cada cruce, con dos tercios siendo hembras como aproximación razonable. Previendo que el número de moscas disponibles para los cruces se podría reducir gradualmente en cada generación, hemos comenzado con un gran volumen de moscas en los primeros cruces (12-14 hembras vírgenes y 5-6 machos por tubo y 4-5 tubos por cruce). Los cruces se han ido cambiando cada semana según apareciesen larvas, hasta un máximo de 4-5 cruces por tubo. De los tubos con larvas, en las ocasiones que ha sido necesario, se han seleccionado las larvas que expresaban Tb (de forma más redondeada que las normales) y se han traspasado a otros tubos. Se ha anotado el día de nacimiento de las primeras moscas y se han recogido hembras vírgenes y machos por separado durante 9 días desde el nacimiento, según el fenotipo necesario para el cruce siguiente.

Drosophila melanogaster es un organismo diploide, es decir, sus cromosomas tienen dos alelos (homólogos) y son pares. Esto quiere decir que cada gen existe en dos copias, excepto los genes del cromosoma X en los machos. Tiene 4 cromosomas: 1 par de heterosomas (X, Y) y 3 pares de autosomas (**Figura 7**). Para el nombramiento por convención los alelos homólogos se separan por una línea horizontal (/) y los cromosomas con punto y coma (;). Una copia de cada gen se hereda del padre y la otra de la madre por lo que solo una copia se pasa de cada progenitor a cada retoño.⁴⁷

Según la segunda ley de Mendel, los cromosomas se agrupan independientemente unos de los otros durante la meiosis. Como estrategia para el esquema de apareamiento se ha considerado el criterio de selección de cada cromosoma independientemente y no se ha tenido en cuenta al cuarto cromosoma ya que alberga muy pocos genes y su genética difiere algo de la de los demás, por lo que su rol es desdeñable.⁴⁷

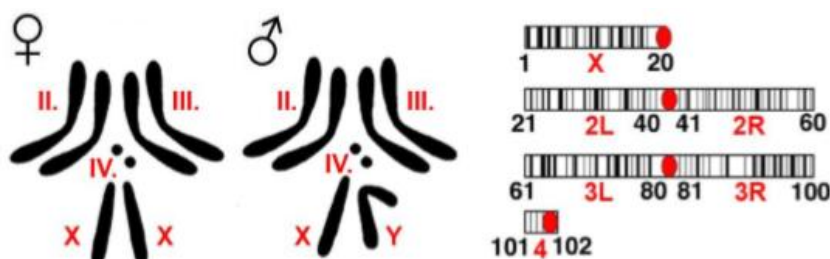


Figura 7. Cromosomas de *Drosophila*

Los genes localizados en el mismo cromosoma se consideran un grupo de unión que tiende a segregarse conjuntamente durante la meiosis. Sin embargo, cuando los cromosomas homólogos se emparejan físicamente en la profase, se pueden dar procesos de recombinación intra-cromosómica (también llamado crossing-over) que pueden llevar al intercambio de material genético entre cromosomas homólogos. Como regla de oro, la frecuencia de recombinación aumenta con la distancia entre *locis* genéticos pero no uniformemente sobre los brazos del cromosoma (map expansion/compression). Por suerte se puede calcular la frecuencia de recombinación para dos genes cuyos locis son conocidos. Para los esquemas de cruces la recombinación puede ser una amenaza o un resultado intencionado para recombinar mutaciones en el mismo cromosoma. Si se quiere prevenir, se pueden usar cromosomas *balancer*.⁴⁷

Los cromosomas *balancer* son esenciales para el mantenimiento de stocks de moscas mutadas y para el diseño de los esquemas de cruces. Estos cromosomas tienen múltiples inversiones a través de las cuales las posiciones relativas de los genes han sido significativamente ordenadas. Los *balancers* se separan con normalidad durante la meiosis pero suprimen la recombinación con un cromosoma de secuencia normal. Los productos de cualquier recombinación que pueda ocurrir son letales por la duplicación y pérdida de fragmentos cromosómicos (aneuploidía de fragmentos cromosómicos). Además, la mayoría de los *balancers* son letales en homocigosis. Otra de las características claves de los cromosomas balancer es la presencia de mutaciones marcadoras dominantes y recesivas. Las dominantes permiten hacer el seguimiento durante los cruces.⁴⁷ Nosotros hemos usado los *balancers* CYO, TM6B y TM3 y a continuación se muestran estos y muchos más ejemplos (**Figura 8**) y la forma en la que se transmiten los genes a generaciones futuras (**Figura 9**).

- **FM7a** (1st multiply-inverted 7a) - cromosoma X - marcadores típicos: y, w^a, sn, B¹
- **FM7c** (1st multiply-marked 7c) - cromosoma X - marcadores típicos: y, sc, w, oc, ptg, B¹
- **Cyo** (Curly derivative of Oster) - segundo cromosoma - marcadores típicos: Cy (Curvo), dp (dumpy; bumpy notum), pr (ojos violetas), cn (ojos cinnabar)
- **SM6a** (2nd multiply-inverted 6a) - segundo cromosoma - marcadores típicos: al, Cy, dp, cn, sp
- **TM3** (3rd multiply-inverted 3) - tercer cromosoma - marcadores típicos: Sb, Ubx^{bx-34e} (bitórax), e, Ser
- **TM6B** (3rd multiply-inverted 6B) - tercer cromosoma - marcadores típicos: Antp^{Hu}, e, Tb (larva de 3ª etapa tubular)

Figura 8. Ejemplos de cromosomas balancer.

Localización y marcadores típicos.

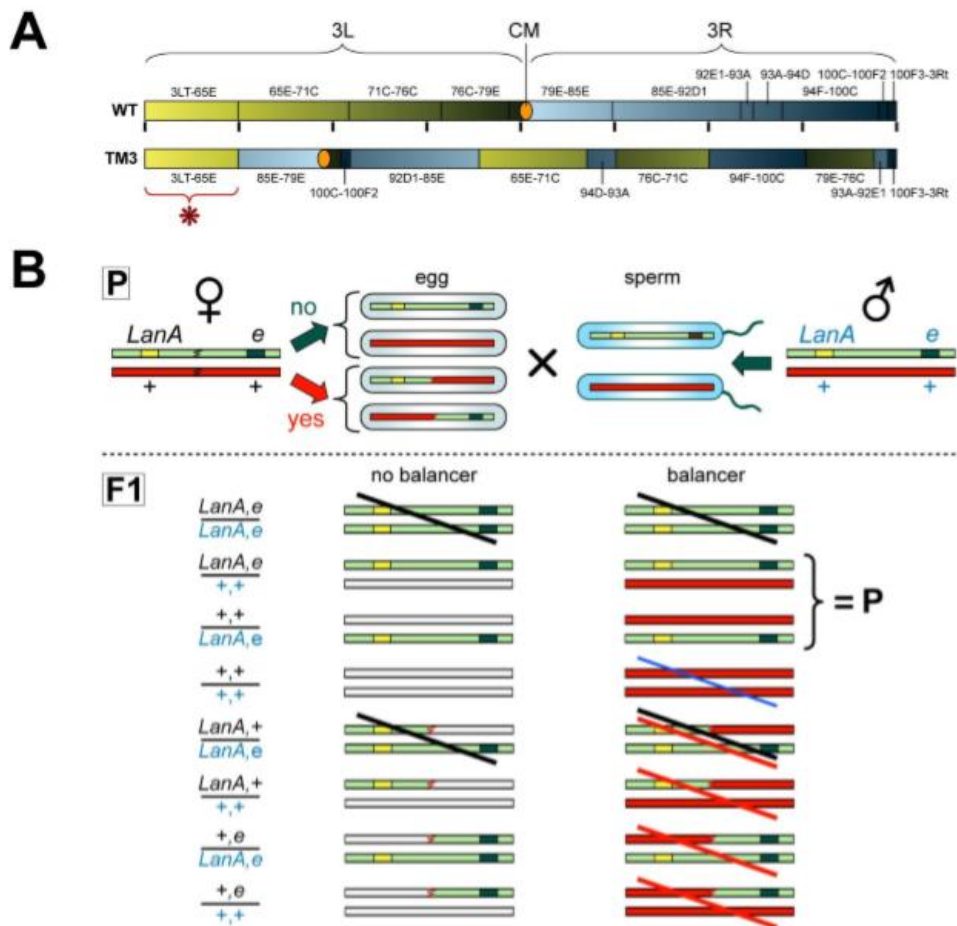


Figura 9.

A Comparación de cromosoma 3 Wild Type con cromosoma balancer TM3.

B LamininA (*LanA*) es una mutación letal en homocigosis y el marcador ebony (*e*) es recesivo. Ambos están en el cromosoma 3 y se conservan mediante un balancer (en rojo). En F1 se comparan los resultados viables del cruce usando o no el balancer. Se observa que sin balancer solo las combinaciones de *LanA* en homocigosis son letales y las 6 restantes viables, de las cuales solo 2 son idénticas a las parentales. Con balancer se eliminan las combinaciones de balancer en homocigosis y las que tuvieron recombinación y siendo solamente viables las idénticas al genotipo parental, ideal para el mantenimiento de los stocks.

3.4 MODELO CON SILENCIAMIENTO DE TBPH Y CAZ EN MÚSCULO ESQUELÉTICO

Para medir los efectos de las moscas con silenciamiento del gen ortólogo en mosca del gen TARDBP humano en tejido específico se ha realizado una parte experimental con la mosca TBPH *minus* en músculo que ha consistido en un ensayo de escalada (*Climbing assay*) y otro ensayo de esperanza de vida (*longevity assay*). Para ello, se han seleccionado las

moscas recién nacidas del cruce de músculo que no expresaran el fenotipo CYO y sus correspondientes controles. Las moscas seleccionadas se han transferido a un tubo aparte durante 24 horas para que machos y hembras copularan (este paso es necesario para asegurar su ciclo de vida y aumentar la supervivencia de los machos equivaliéndola a una situación no experimental). Tras ello, se ha procedido a separar hembras y machos y crear grupos de 5 moscas, almacenándolas en tubos identificados con CAZ o subtipo de TBPH que tienen silenciado, sexo y día de nacimiento. A los pocos días ha sido necesario cambiar las hembras a tubos nuevos por la formación de larvas en casi todos los tubos de hembras.

3.4.1 Ensayo de escalada

El *Climbing assay* se ha llevado a cabo transfiriendo cada grupo de 5 moscas (que tienen sexo y día de nacimiento concretos y CAZ silenciado, un subtipo de TBPH silenciado o el reportero del músculo) a un cilindro de 50ml sin anestesia. Después de esperar 30 segundos de adaptación, se ha medido la habilidad de escalada mediante el conteo de moscas que había sobrepasado en 10 segundos la línea verde dibujada a 8 cm en el cilindro. Únicamente se ha considerado la prueba válida si, tras unos golpecitos, al inicio del registro las 5 moscas se encontraban en la base del cilindro o por debajo de la línea negra que está a 4 cm de la base. Se ha registrado mediante grabación y se ha realizado el experimento dos veces con cada muestra de 5 moscas, de modo que se ha obtenido el resultado calculando el porcentaje de moscas que había sobrepasado la línea de los 8 cm en 10 segundos, consiguiendo dos porcentajes por tubo y calculando su media. El primer *Climbing* se ha realizado a los 10 días del nacimiento de las moscas en todos los casos y este experimento se ha repetido a los 15, 20 etc. días del nacimiento hasta encontrar diferencias con el grupo control.

3.4.2 Ensayo de esperanza de vida

El *longevity assay* se ha efectuado mediante la revisión diaria de los tubos y la cuantificación de moscas fallecidas cada día. Si ocurría el fallecimiento de alguna, el resto de las moscas de ese mismo tubo se transfería a un tubo nuevo y se han hecho trasposos generales a tubos nuevos cada semana o previamente por formación de larvas. Cabe destacar que unas pocas moscas se perdieron durante el trasposo al cilindro o viceversa para el *Climbing* y no por fallecimiento, las cuales no se han incluido en los resultados, pudiendo encontrar tubos de 4 o 3 moscas en ellos. Se ha medido la supervivencia y comparado con el grupo control de 77 moscas CAZ minus en músculo, 56 moscas TBPH9 minus, 73 moscas TBPHBloomington minus, respecto a 90 moscas control con el reportero del músculo.

3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para analizar los resultados obtenidos en el ensayo de escalada, se han realizado comparaciones de T-student para muestras independientes (y en un caso para muestras pareadas). Se han considerado estadísticamente significativos los valores de $*p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 OBTENCIÓN DEL MODELO CON SILENCIAMIENTO DE TBPH Y CAZ EN GLÍA

Para generar moscas viables que silencien TBPH y CAZ en células gliales, es imprescindible realizar una serie de cruzamientos en paralelo a veces y en serie en otras, para a través de los marcadores fenotípicos ir seleccionando los genotipos de mosca de interés. La selección de los genotipos se realiza siguiendo las leyes de Mendel por las que se rige la genética en *Drosophila melanogaster*. Además nos apoyamos en marcadores fenotípicos para identificar el genotipo de cada mosca y seleccionarla o no según interese. Los primeros cruces buscan seleccionar moscas con los alelos reconocibles y con balanceadores genéticos mediante marcadores fenotípicos, para finalmente asegurar que la mosca final experimental realmente expresa el RNA interferente (RNAi) para el gen deseado específicamente en el tejido deseado.

En este sentido, el primer cruce se ha realizado con hembras vírgenes (W1118)²; (DCR2)²; (+)² y machos que expresaran los 4 marcadores (W1118)²; Wgsp/Cyo; Ki/TM6B-Tb. De los tubos con larvas se han seleccionado las larvas que expresaban Tb. Tras el nacimiento de las primeras moscas, sólo se han recogido las moscas que expresaban Cyo (alas curvas) y se han desechado las que expresaban Wgsp (pelo axilar largo) y Ki (pelo corto erizado), por lo que se ha conseguido el genotipo (W1118)²; DCR2/Cyo; +/-TM6B-Tb en la primera generación, F1 de DICER2 (**Figura 10**). De esta forma, se ha conseguido una mosca portadora de DCR2, primer paso necesario para la producción de RNAi, y marcadores fenotípicos (Cyo y Tb), de utilidad para asegurar la correcta elección de los genotipos posteriores. Cabe destacar que se han elegido Cyo y TM6BTb por ser ambos cromosomas balanceadores. Esto nos procura las ventajas de evitar la recombinación en los cromosomas 2 y 3 (dónde se localizan los genes de interés para este experimento, asegurando su transmisión a la siguiente generación) y reducir el número de genotipos viables diferentes en

el próximo cruce (dos balanceadores en el mismo cromosoma resultan letales en la siguiente generación), facilitando la selección de los genotipos de interés en siguientes generaciones.

$$\begin{array}{c}
 \text{♀} \frac{W1118}{W1118}; \frac{DCR2}{DCR2}; \frac{+}{+} \quad \times \quad \text{♂} \frac{W1118}{W1118}; \frac{Wgsp}{CyO}; \frac{Ki}{TM6B Tb} \\
 \Downarrow \\
 \frac{W1118}{W1118}; \frac{DCR2}{Wgsp}; \frac{+}{Ki} \quad \frac{W1118}{W1118}; \frac{DCR2}{CyO}; \frac{+}{Ki} \\
 \\
 \frac{W1118}{W1118}; \frac{DCR2}{Wgsp}; \frac{+}{TM6B Tb} \quad \frac{W1118}{W1118}; \frac{DCR2}{CyO}; \frac{+}{TM6B Tb} \quad (25\%)
 \end{array}$$

Figura 10. Obtención de F1 de DICER2.

El segundo cruce se ha realizado con hembras vírgenes que expresaban los 4 marcadores (W1118)₂; Wgsp/Cyo; Ki/TM6B-Tb y machos de la generación F1 de DICER2 (W1118)₂; DCR2/Cyo; +/TM6B-Tb. Se han vuelto a seleccionar larvas Tb y de las moscas adultas se han elegido las hembras vírgenes y machos Cyo y Ki, desechando las que expresaban Wgsp. De esta manera se ha conseguido una segunda generación, F2 de DICER2 (**Figura 11**), con genotipo (W1118)₂; DCR2/Cyo; Ki/TM6B-Tb con la cual se ha generado un nuevo genotipo stock que se puede conservar en el laboratorio. El objetivo ha sido obtener una mosca de DCR2 con una marcador fenotípico más (Ki) que sería de ayuda para identificar el genotipo deseado en el próximo cruce.

$$\begin{array}{c}
 \text{♀} \frac{W1118}{W1118}; \frac{Wgsp}{CyO}; \frac{Ki}{TM6B Tb} \quad \times \quad \text{♂} \frac{W1118}{W1118}; \frac{DCR2}{CyO}; \frac{+}{TM6B Tb} \\
 \Downarrow \\
 \frac{W1118}{W1118}; \frac{DCR2}{Wgsp}; \frac{+}{Ki} \quad \frac{W1118}{W1118}; \frac{DCR2}{CyO}; \frac{+}{Ki}
 \end{array}$$

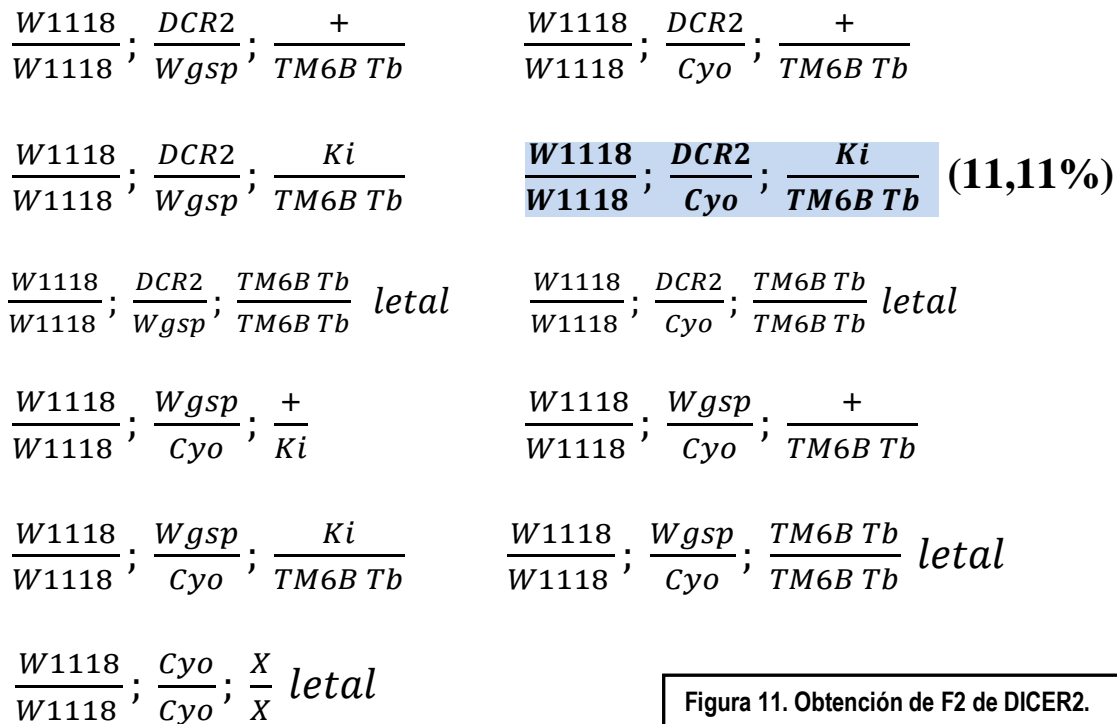
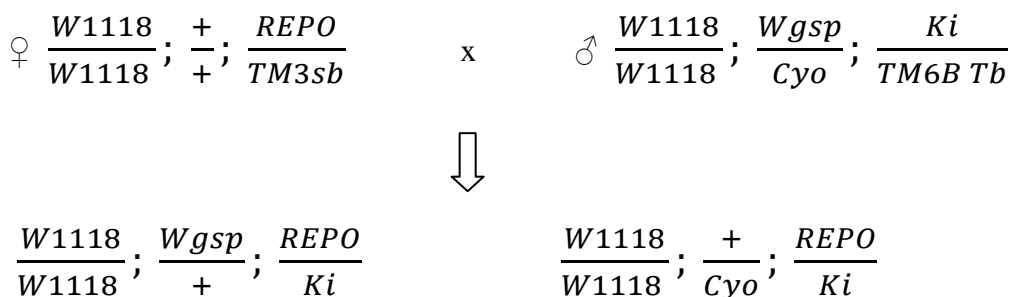


Figura 11. Obtención de F2 de DICER2.

Los cruces del gen reportero de expresión glial REPO se han realizado en paralelo. El primer cruce ha sido de hembras vírgenes (W1118)₂; (+)₂; REPO/TM3sb y machos que expresan los 4 marcadores (W1118)₂; Wgsp/Cyo; Ki/TM6B-Tb. De los tubos con larvas se han seleccionado las larvas que expresaban Tb. De las moscas adultas se han elegido las que expresaban Cyo y se han descartado las que expresaban Wgsp, TM3sb (pelo corto) y Ki. El resultado ha sido el genotipo (W1118)₂; +/Cyo; REPO/TM6B-Tb en la primera generación, F1 de REPO (**Figura 12**). El objetivo era conseguir una mosca portadora de REPO, el reportero de glía que es el tejido en el que queremos expresar el RNAi de TBPH o CAZ, con marcadores fenotípicos balanceadores (Cyo y Tb).



$$\frac{W1118}{W1118}; \frac{Wgsp}{+}; \frac{Ki}{TM3sb}$$

$$\frac{W1118}{W1118}; \frac{+}{Cyo}; \frac{Ki}{TM3sb}$$

$$\frac{W1118}{W1118}; \frac{Wgsp}{+}; \frac{REPO}{TM6B Tb}$$

$$\frac{W1118}{W1118}; \frac{+}{Cyo}; \frac{REPO}{TM6B Tb} \quad (16,67\%)$$

$$\frac{W1118}{W1118}; \frac{Wgsp}{+}; \frac{TM3sb}{TM6B Tb} \quad \text{letal}$$

$$\frac{W1118}{W1118}; \frac{+}{Cyo}; \frac{TM3sb}{TM6B Tb} \quad \text{letal}$$

Figura 12. Obtención de F1 de REPO.

El segundo cruce del reportero de glía se ha realizado con la generación F1 de REPO (W1118)2; +/Cyo; REPO/TM6B-Tb y las moscas que expresaban los 4 marcadores (W1118)2; Wgsp/Cyo; Ki/TM6B-Tb. Se han vuelto a seleccionar larvas Tb y de las moscas adultas se han elegido las hembras vírgenes y machos Cyo y Wgsp simultáneamente, desechando las que expresaban Ki. De esta manera se ha conseguido una segunda generación, F2 de REPO (**Figura 13**), con genotipo (W1118)2; Wgsp/Cyo; REPO/TM6B-Tb (con una marcador fenotípico más, en este caso, Wgsp ya que en DCR elegimos Ki) preparada para cruzar con el stock constituido de F2 de DCR2.

$$\begin{array}{ccc} \text{♀} \frac{W1118}{W1118}; \frac{+}{Cyo}; \frac{REPO}{TM6B Tb} & \times & \text{♂} \frac{W1118}{W1118}; \frac{Wgsp}{Cyo}; \frac{Ki}{TM6B Tb} \\ & & \Downarrow \\ \frac{W1118}{W1118}; \frac{+}{Wgsp}; \frac{REPO}{Ki} & & \frac{W1118}{W1118}; \frac{+}{Cyo}; \frac{REPO}{Ki} \\ \frac{W1118}{W1118}; \frac{+}{Wgsp}; \frac{REPO}{TM6B Tb} & & \frac{W1118}{W1118}; \frac{+}{Cyo}; \frac{REPO}{TM6B Tb} \\ \frac{W1118}{W1118}; \frac{+}{Wgsp}; \frac{Ki}{TM6B Tb} & & \frac{W1118}{W1118}; \frac{+}{Cyo}; \frac{Ki}{TM6B Tb} \end{array}$$

$$\frac{W1118}{W1118}; \frac{+}{Wgsp}; \frac{TM6B Tb}{TM6B Tb} \text{ letal} \quad \frac{W1118}{W1118}; \frac{+}{Cyo}; \frac{TM6B Tb}{TM6B Tb} \text{ letal}$$

$$\frac{W1118}{W1118}; \frac{Wgsp}{Cyo}; \frac{REPO}{Ki} \quad \frac{W1118}{W1118}; \frac{Wgsp}{Cyo}; \frac{REPO}{TM6B Tb} \quad (11, 11\%)$$

$$\frac{W1118}{W1118}; \frac{Wgsp}{Cyo}; \frac{Ki}{TM6B Tb} \quad \frac{W1118}{W1118}; \frac{Wgsp}{Cyo}; \frac{TM6B Tb}{TM6B Tb} \text{ letal}$$

$$\frac{W1118}{W1118}; \frac{Cyo}{Cyo}; \frac{X}{X} \text{ letal}$$

Figura 13. Obtención de F2 de REPO.

El tercer cruce ha consistido en juntar F2 de DICER2 (del stock) (W1118)²; DCR2/Cyo; Ki/TM6B-Tb con F2 de REPO (W1118)²; Wgsp/Cyo; REPO/TM6B-Tb. Se han traspadado las larvas Tb a otros tubos y de las moscas nacidas de estas, se han recogido las hembras vírgenes y los machos que expresaban Cyo, desechando las Wgsp y las Ki. Por consiguiente se ha conseguido el genotipo (W1118)²; DCR2/Cyo; REPO/TM6B-Tb en la generación F3 (**Figura 14**). Éste ha sido el resultado final de esta parte de este trabajo, con el que se ha generado un stock para poder seguir con la experimentación a partir del avance hasta este punto y que es de gran utilidad para el proyecto de investigación del que forma parte en el grupo de Bionostia.

$$\frac{W1118}{W1118}; \frac{DCR2}{Cyo}; \frac{Ki}{TM6B Tb} \text{ (stock)} \times \frac{W1118}{W1118}; \frac{Wgsp}{Cyo}; \frac{REPO}{TM6B Tb}$$



$$\frac{W1118}{W1118}; \frac{DCR2}{Wgsp}; \frac{REPO}{Ki} \quad \frac{W1118}{W1118}; \frac{DCR2}{Cyo}; \frac{REPO}{Ki}$$

$$\frac{W1118}{W1118}; \frac{DCR2}{Wgsp}; \frac{REPO}{TM6B Tb} \quad \frac{W1118}{W1118}; \frac{DCR2}{Cyo}; \frac{REPO}{TM6B Tb} \quad (11, 11\%)$$

$$\frac{W1118}{W1118}; \frac{DCR2}{Wgsp}; \frac{Ki}{TM6B Tb} \quad \frac{W1118}{W1118}; \frac{DCR2}{Cyo}; \frac{Ki}{TM6B Tb}$$

$$\frac{W1118}{W1118}; \frac{DCR2}{Wgsp}; \frac{TM6B Tb}{TM6B Tb} \text{ letal} \quad \frac{W1118}{W1118}; \frac{DCR2}{Cyo}; \frac{TM6B Tb}{TM6B Tb} \text{ letal}$$

$$\frac{W1118}{W1118}; \frac{Wgsp}{Cyo}; \frac{REPO}{Ki} \quad \frac{W1118}{W1118}; \frac{Wgsp}{Cyo}; \frac{REPO}{TM6B Tb}$$

$$\frac{W1118}{W1118}; \frac{Wgsp}{Cyo}; \frac{Ki}{TM6B Tb} \quad \frac{W1118}{W1118}; \frac{Wgsp}{Cyo}; \frac{TM6B Tb}{TM6B Tb} \text{ letal}$$

$$\frac{W1118}{W1118}; \frac{Cyo}{Cyo}; \frac{X}{X} \text{ letal}$$

Figura 14. Obtención de F3.

Finalmente, se explica la teoría de los últimos cruces que son los que realmente alcanzan a generar el modelo deseado para el estudio exhaustivo de la hipótesis general del proyecto. Ha consistido en cruzar la generación F3 y con los diferentes genotipos de mosca que expresan los respectivos RNAs interferentes de los genes de TBPH y CAZ para de esta manera conseguir el modelo que tiene el gen TBPH o CAZ silenciado en glía. Por lo que se ha cruzado el genotipo F3 (W1118)²; DCR2/Cyo; REPO/TM6B-Tb con los genotipos de TBPH y CAZ, (W1118)²; TBPH iRNA/TBPH iRNA; (+)² y (W1118)²; CAZ iRNA/CAZ iRNA; (+)² respectivamente. De este cruce se han apartado las larvas Tb, esta vez para eliminarlas y se han escogido las moscas que no eran Cyo, consiguiendo la mosca modelo experimental de varios genotipos TBPH y CAZ (**Figura 15**):

- (W1118)²; DCR2/TBPH9; REPO/+
- (W1118)²; DCR2/TBPH401; REPO/+
- (W1118)²; DCR2/TBPHBloomington; REPO/+
- (W1118)²; DCR2/CAZ; REPO/+

$$\frac{W1118}{W1118}; \frac{DCR2}{Cy0}; \frac{REPO}{TM6B Tb} \quad \times \quad \frac{W1118}{W1118}; \frac{TBPH}{Cy0}; \frac{+}{+}$$



$$\frac{W1118}{W1118}; \frac{DCR2}{TBPH}; \frac{REPO}{+} \quad (16,67\%) \quad \frac{W1118}{W1118}; \frac{DCR2}{Cy0}; \frac{REPO}{+}$$

$$\frac{W1118}{W1118}; \frac{DCR2}{TBPH}; \frac{+}{TM6B Tb}$$

$$\frac{W1118}{W1118}; \frac{DCR2}{Cy0}; \frac{+}{TM6B Tb}$$

$$\frac{W1118}{W1118}; \frac{TBPH}{Cy0}; \frac{REPO}{+}$$

$$\frac{W1118}{W1118}; \frac{TBPH}{Cy0}; \frac{+}{TM6B Tb}$$

$$\frac{W1118}{W1118}; \frac{Cy0}{Cy0}; \frac{X}{X} \quad \text{letal}$$

Se han conseguido los genotipos:

$$\frac{W1118}{W1118}; \frac{DCR2}{TBPH9}; \frac{REPO}{+}$$

$$\frac{W1118}{W1118}; \frac{DCR2}{TBPH401}; \frac{REPO}{+}$$

$$\frac{W1118}{W1118}; \frac{DCR2}{TBPHBlo}; \frac{REPO}{+}$$

$$\frac{W1118}{W1118}; \frac{DCR2}{CAZ}; \frac{REPO}{+}$$

Figura 15. Obtención del modelo final.

4.2 OBTENCIÓN DEL MODELO CON SILENCIAMIENTO DE TBPH Y CAZ EN MÚSCULO

El único cruce que ha sido necesario realizar ha consistido en juntar el genotipo de la mosca control (DCR2)2; (+)2; (MEF2)2 con cada uno de los genotipos TBPH o CAZ, (W1118)2; TBPH iRNA/CYO; (+)2 y (W1118)2; (CAZ iRNA)2; (+)2 respectivamente. Este cruce ha sido suficiente ya que existe una mosca disponible comercialmente que expresa DICER2 y el reportero de expresión en músculo MEF2. Para el cruce de CAZ se han usado hembras vírgenes CAZ (W1118)2; (CAZ)2; (+)2 y machos control. Para el de TBPH9 ha sido al revés, hembras vírgenes control con machos TBPH9 (W1118)2; (TBPH9)2; (+)2. El cruce

de TBPHBloomington se ha realizado con hembras vírgenes Bloomington (W1118); TBPHBlo/CYO; (+)2 y machos control. El cruce de TBPH401 no ha sido satisfactorio porque ha resultado escaso y no se ha incluido en el estudio. Al nacimiento se han ido seleccionando las moscas que no expresaban CYO. Esta selección del genotipo DCR2/W1118; TBPH/+; MEF2/+ (**Figura 16**) se ha incorporado directamente a los ensayos experimentales de escalada y de longevidad.

$$\begin{array}{ccc}
 \text{♀ } \frac{W1118}{W1118}; \frac{TBPH}{CYO}; \frac{+}{+} & \times & \text{♂ } \frac{DCR2}{DCR2}; \frac{+}{+}; \frac{MEF2}{MEF2} \\
 & & \Downarrow \\
 \frac{DCR2}{W1118}; \frac{TBPH}{+}; \frac{MEF2}{+} \text{ (50\%)} & & \frac{DC2}{W1118}; \frac{+}{CyO}; \frac{MEF2}{+}
 \end{array}$$

Figura 16. Obtención del modelo con silenciamiento de TBPH Y CAZ en músculo.

4.3 RESULTADOS DEL ENSAYO DE ESCALADA

El primer resultado a destacar hace referencia a la caracterización del modelo. Por eso, la figura 17 se centra en que efectivamente las moscas van perdiendo capacidad locomotora dependiendo del tiempo de vida. En la siguiente figura nos centraremos en la capacidad diferencial de escalada dependiendo del genotipo y por lo tanto, analizaremos si realmente el silenciamiento de estos genes condiciona un fenotipo motor diferencial que sirva como *screening* primario de posibles nuevos fármacos. En la **Figura 17** observamos que el día 10 todos los genotipos tienen mayor capacidad de escalada que en los días consecutivos, aunque solo encontremos diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo de TBPH-Bloomington-RNAi del día 10 con el del día 20 (*p<0,05). También detectamos que el subtipo TBPH9-RNAi obtiene mejores resultados que el control el día 10 pero menor porcentaje promedio de escalada que el control el día 15, lo cual hace referencia a que la caracterización del modelo TBPH9-RNAi podría ser la correcta aunque no sea reconocible

desde el principio. El día 20 no se recogieron suficientes datos de algunos de los genotipos para incluirlos en este estudio.

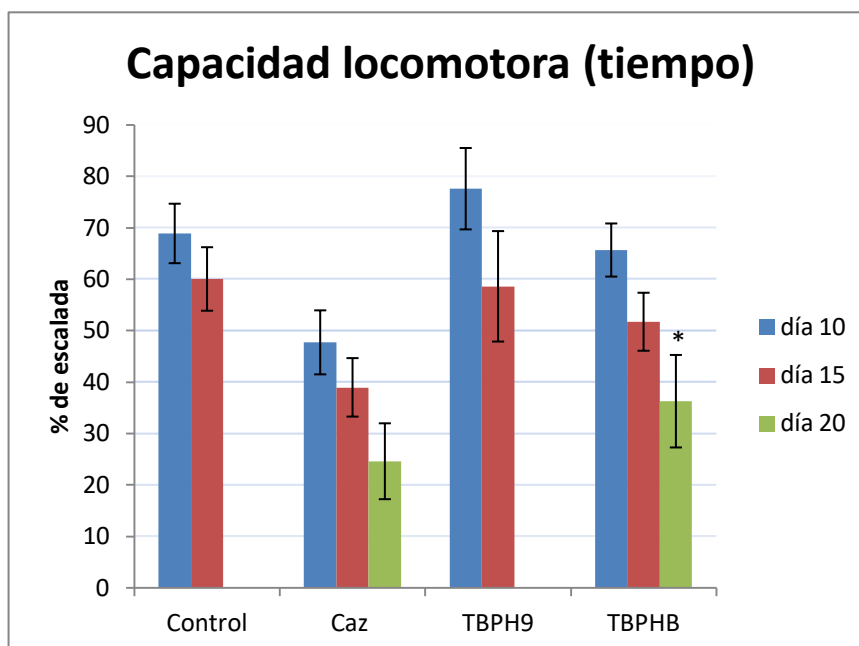


Figura 17. Capacidad locomotora (tiempo).

Por otro lado vamos a realizar otro análisis de diferencias según genotipo. En la **Figura 18** observamos que el genotipo Caz minus en músculo es el que está más afectado. Esta afectación es estadísticamente significativa respecto al grupo control (* $p < 0,05$). Esto quiere decir que el genotipo con silenciamiento de Caz en músculo tiene un fenotipo motor alterado y por ello, se selecciona para futuros ensayos que pudieran demostrar que es un modelo efectivo de ELA y sus mecanismos. Para los genotipos TBPH9-RNAi y TBPH-Bloomington-RNAi no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control aunque se podría deducir que el silenciamiento de TBPH en los subtipos TBPH9-RNAi y TBPH-Bloomington-RNAi podría no haberse dado en el mismo grado. Y esto podría deberse a que los silenciamientos ocurren en locus diferentes, pudiendo esto provocar que sean más o menos efectivos. Los datos obtenidos sugieren que el silenciamiento pudo ser mayor en el subtipo TBPH-Bloomington-RNAi. Aunque en ambos genotipos sean necesarios más estudios (y más duraderos) si se quieren encontrar diferencias respecto a los controles.

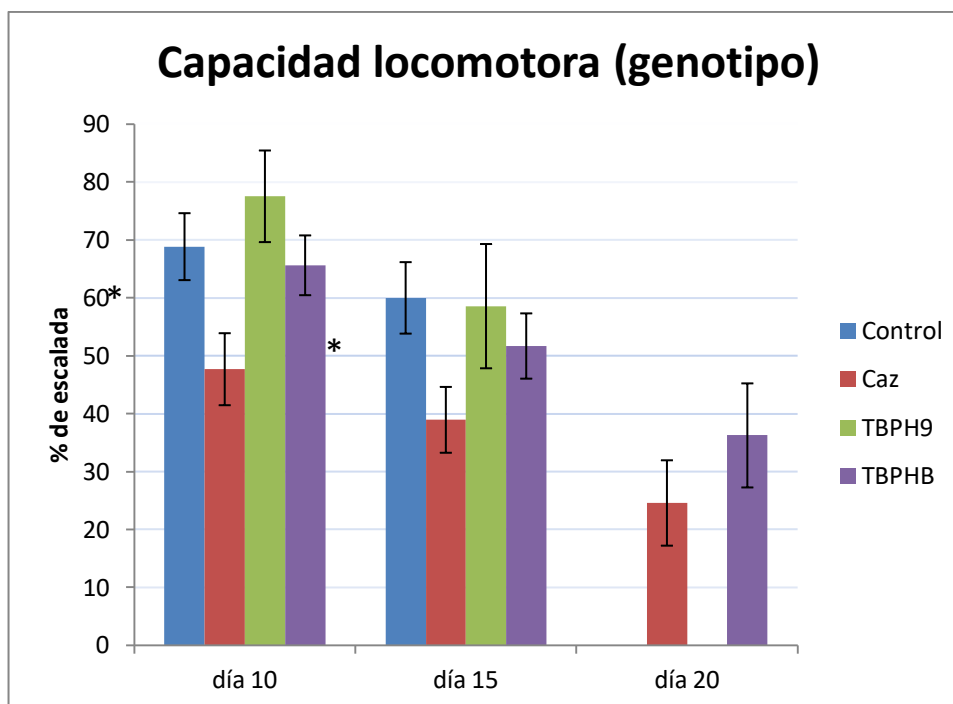


Figura 18. Capacidad locomotora (genotipo).

4.4. RESULTADOS DEL ENSAYO DE LONGEVIDAD

Hemos llevado a cabo un seguimiento de la supervivencia de las moscas con CAZ y TBPH silenciados en músculo así como de sus respectivos controles (el genotipo de DICER2 y el reportero del músculo MEF2) durante 27 días, que es el tiempo que se ha dispuesto para la experimentación en este trabajo una vez obtenidas las moscas experimentales. En este período de tiempo los resultados han sido los siguientes, visibles también en la gráfica (Figura 19):

- Se han muerto 4 moscas en total del grupo de las 77 moscas CAZ *minus* en músculo.
- Se han muerto 3 del grupo de las 56 moscas TBPH9 *minus* en músculo.
- Se han muerto 3 moscas en total del grupo de las 73 moscas TBPHBloomington *minus* en músculo.
- Se han muerto 6 en el grupo control que consistía en 90 moscas.

Los datos recogidos no han resultado resolutorios, haciendo recomendable un tiempo de seguimiento mayor.

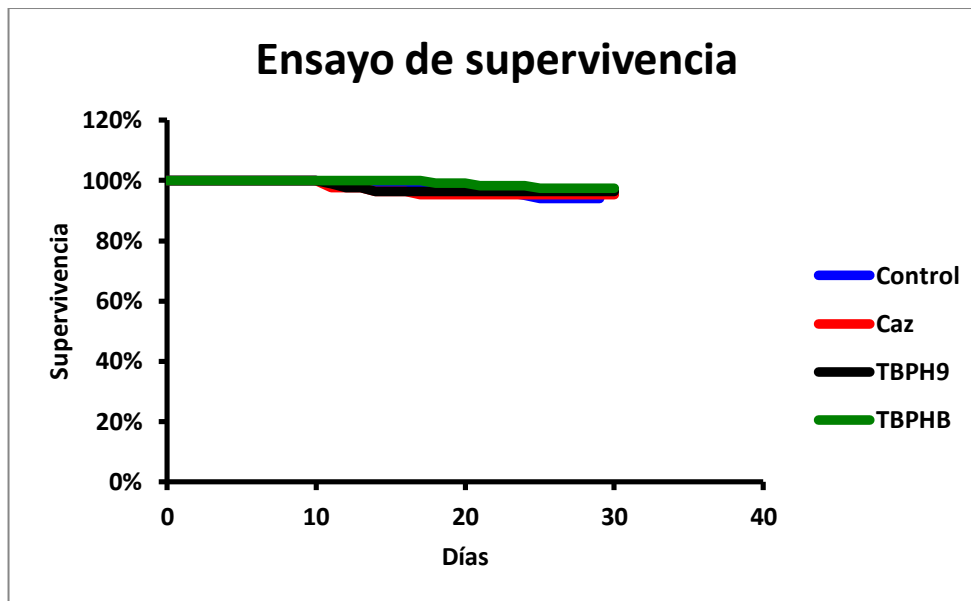


Figura 19. Ensayo de longevidad

Finalmente, a modo aclaratorio la nomenclatura utilizada para los diferentes genotipos de mosca (controles, Caz-iRNA, TBPH9-iRNA y TBPHB-iRNA o bien *Caz minus* en músculo etc.) se refiere a los modelos en los que se silencia el gen nombrado en el tejido específico.

5. DISCUSIÓN

En resultados obtenidos (no publicados) del laboratorio de enfermedades neuromusculares del Instituto Biodonostia se han detectado alteraciones significativas en modelos in-vitro de silenciamientos de los genes TARDP43, SOD1 y FUS y pensamos que estos genes podrían estar implicados en la diferenciación de mioblastos y regeneración muscular. Además, tenemos evidencias de que el metabolismo energético puede estar directamente implicado en estas alteraciones, ya que se han detectado un mayor número de mitocondrias en estos modelos animales con patología TDP43.⁴⁹ En modelos transgénicos murinos de TDP43, se produce un incremento de biosíntesis de mitocondrias como mecanismo de compensación del fallo energético o como un reflejo de disfunciones en procesos tales como la mitofagia y autofagia.

Además de que el metabolismo energético podría tener un papel primario en la aparición de la enfermedad, realmente no se conoce si este fallo energético afecta a todos los tipos

celulares implicados en la enfermedad de la ELA (motoneurona cortical superior, motoneurona espinal, astrocito y miocitos) y en segundo lugar, en caso de afectar a todos ellos, se desconoce igualmente dónde está el origen primario de la alteración que desencadene la manifestación de la patología. Por ello, en este proyecto hemos querido silenciar específicamente los genes de interés en estos tipos celulares de forma independiente para observar si éstas alteraciones tienen la capacidad de propagarse a los otros integrantes de la unión neuromuscular y más relevantemente, manifestar algunos de los síntomas típicos de la enfermedad en humanos. Para ello, estamos utilizando el modelo de *Drosophila melanogaster*, en el que ya se han descrito los efectos de algunos de estos silenciamientos en alguno de estos tipos celulares³⁵. Sin embargo, no se ha abordado una visión integrada de estos modelos y además algunos de ellos tampoco han sido estudiados en profundidad. Ésta precisamente es la proyección de este trabajo que de cumplir con los objetivos iniciales sería realmente revolucionario y clave para encontrar nuevas vías de tratamiento para la enfermedad, ya que queremos modelizar de manera global la enfermedad para que, con mayor probabilidad, las conclusiones puedan extrapolarse a la enfermedad humana.

Este trabajo fin de grado se ubica en las fases iniciales del proyecto, por lo que se ha centrado en la generación de algunos de los modelos necesarios para estudiar nuestra hipótesis principal. En este sentido, se han generado modelos in-vivo de *Drosophila* con silenciamiento en los genes ortólogos de mosca TBPH y CAZ, homólogos de TARDP43 y FUS humanos, respectivamente. Este silenciamiento ha sido además tejido-específico afectando independientemente a células gliales o a músculo.

En cuanto a las limitaciones y problemas que han surgido durante el trabajo en el laboratorio, se ha padecido de contaminación por hongos tanto en los tubos para la generación del modelo como en los tubos de ensayo. Esto ha obligado a tirar tubos que estaban destinados a la generación del modelo y a cambiar continuamente las moscas de tubos que contenían hongos a tubos nuevos, en los destinados a los ensayos. Cabe destacar que en estos últimos la contaminación se ha dado únicamente en el grupo control, pudiendo haber alterado especialmente los resultados de supervivencia, ya que observamos que en proporción mueren más moscas del grupo de los controles que del resto.

Otro de los impedimentos que han retrasado la obtención del modelo con silenciamiento en glía ha sido la inefectividad del primer cruce de REPO con la mosca de los cuatro marcadores para la adquisición de la primera generación de REPO. Y es que a pesar de los porcentajes teóricos en los que aproximadamente el 16% de las moscas recién nacidas iban a

presentar el fenotipo de selección, la realidad ha sido que las larvas de este cruce tardaban mucho en aparecer, en nacer y además nacían pocas moscas de los tubos Tb (pudiendo esto ser debido a que se apreciaba más fragilidad de estas larvas a la manipulación), de las cuales apenas ninguna mostraba el fenotipo de interés. Al ver que este cruce estaba resultando inefectivo, se usó algún tubo más. Siete semanas desde el inicio, al fin, se logró dar comienzo al siguiente cruce de REPO, mientras seguía la selección de 14 hembras vírgenes y 2 machos en total (se pusieron 4 tubos con tan solo 4-5 hembras en cada uno). Todo lo mencionado ha provocado que el segundo cruce de REPO y el TFG en general se haya alargado en el tiempo y se tenga que seguir hasta la obtención del modelo final, dado a su importancia.

Este ambicioso proyecto persigue no sólo avanzar en el conocimiento de las causas de aparición y desarrollo de la enfermedad, sino que busca entender sus bases moleculares que resultarán claves en el diseño de un tratamiento eficaz para los pacientes con ELA y posiblemente otras enfermedades con patología TDP-43 como la DFT. Este trabajo fin de grado constituye la base importante y necesaria para responder a la hipótesis principal del proyecto de investigación presentado.

6. CONCLUSIONES

La estrategia para generar estos modelos animales en esencia ha sido la misma, pero la obtención del modelo de silenciamiento de estos genes en glía ha resultado realmente laboriosa, ya que se han tenido que realizar numerosos cruces en serie y en paralelo para finalmente generar el genotipo de interés. No tanto así, en los modelos de silenciamiento en músculo ya que la disponibilidad comercial de estas moscas era mayor.

En cuanto a la caracterización fenotípica del modelo hemos realizado ensayos de escalada y de esperanza de vida que son las principales pruebas de comportamiento que se realiza en este modelo animal. Los resultados obtenidos en las pruebas de escalada evidencian que, a medida avanzan los días la capacidad de escalada de las moscas con estos genes silenciados disminuye. Esto atiende a razones puramente fisiológicas aunque en este caso afecta más pronunciadamente a los genotipos de mosca con silenciamiento de alguno de los genes de interés en este proyecto. Este resultado no hace sino validar y reforzar el modelo utilizado.

Por otra parte, en la prueba de escalada resultados preliminares pendientes de confirmar con tamaños muestrales más importantes sugieren que la capacidad locomotora de las moscas que silencian *Caz* en músculo está disminuida. Este resultado concuerda con los resultados obtenidos por Ruohan y cols donde observan además que el silenciamiento de *Caz* y *TBPH* acentúa estos efectos⁵⁰. Además también se detecta una disminución en el modelo definitivo con nomenclatura *TBPHB*, eso sí de menor magnitud, sugiriendo que en los modelos generados el silenciamiento de los genes de interés se ha realizado correctamente. Es necesario añadir que en uno de los modelos generados los resultados no muestran un fenotipo claro de las moscas con silenciamiento en músculo (*TBPH9*). Aunque este resultado pueda parecer sorprendente, es necesario resaltar que los diferentes modelos de mosca utilizados para silenciar *TBPH* tanto en músculo como en glía, silencian en forma y magnitud diferente según la región del gen a la que se dirige el RNAi que sobreexpresa cada modelo de mosca. De esta manera, se puede explicar que el silenciamiento del gen no afecta de la misma manera en los diferentes modelos. De hecho, éste era uno de los objetivos iniciales de este TFG, ya que gracias a él podemos discernir con qué modelos se va a seguir adelante en el proyecto. Estos resultados de silenciamiento diferencial según el modelo y estrategia de silenciamiento utilizados se han reportado ampliamente en la literatura^{35,51}.

7. RECONOCIMIENTOS / CONFLICTO DE INTERÉS / AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido respaldado por el instituto BioDonostia y agradezco a los Drs. Gorka Gereñu Lopetegi y Adolfo López de Munain por su supervisión y ayuda con la redacción del manuscrito. No se declaran conflictos de interés.

8. REFERENCIAS

1. Al-Chalabi, A., van den Berg, L. H. & Veldink, J. Gene discovery in amyotrophic lateral sclerosis: implications for clinical management. *Nat. Rev. Neurol.* **13**, 96–104 (2017).
2. Logroscino, G. *et al.* Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Europe. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **81**, 385–90 (2010).
3. Joensen, P. Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in the Faroe Islands. *Acta Neurol. Scand.* **126**, 62–6 (2012).

4. Marin, B. *et al.* Clinical and demographic factors and outcome of amyotrophic lateral sclerosis in relation to population ancestral origin. *Eur. J. Epidemiol.* **31**, 229–245 (2016).
5. Chia, R., Chiò, A. & Traynor, B. J. Novel genes associated with amyotrophic lateral sclerosis: diagnostic and clinical implications. *The Lancet Neurology* (2018). doi:10.1016/S1474-4422(17)30401-5
6. Brooks, B., Miller, R., Swash, M. & Munsat, T. El Escorial revisited: Revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases. *Amyotroph. Lateral Scler. Other Mot. Neuron Disord.* (2000). doi:10.1080/146608200300079536
7. Kuzel, A. R., Lodhi, M. U., Syed, I. A. & Rahim, M. Atypical Initial Presentation of Painful Muscle Cramps in a Patient with Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Case Report and Brief Review of the Literature. *Cureus* (2017). doi:10.7759/cureus.1837
8. Steyn, F. J. *et al.* Hypermetabolism in ALS is associated with greater functional decline and shorter survival. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* (2018). doi:10.1136/jnnp-2017-317887
9. Hardiman, O., Van Den Berg, L. H. & Kiernan, M. C. Clinical diagnosis and management of amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Reviews Neurology* (2011). doi:10.1038/nrneurol.2011.153
10. Phukan, J. *et al.* The syndrome of cognitive impairment in amyotrophic lateral sclerosis: a population-based study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **83**, 102–108 (2012).
11. M., E. *et al.* Cognitive changes predict functional decline in ALS: A population-based longitudinal study. *Neurology* (2013).
12. Neumann, M. *et al.* Ubiquitinated TDP-43 in Frontotemporal Lobar Degeneration and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Science (80-.)*. **314**, 130–133 (2006).
13. DeJesus-Hernandez, M. *et al.* Expanded GGGGCC Hexanucleotide Repeat in Noncoding Region of C9ORF72 Causes Chromosome 9p-Linked FTD and ALS. *Neuron* **72**, 245–256 (2011).
14. Renton, A. E. *et al.* A Hexanucleotide Repeat Expansion in C9ORF72 Is the Cause of Chromosome 9p21-Linked ALS-FTD. *Neuron* **72**, 257–268 (2011).
15. Paganoni, S. *et al.* Developing multidisciplinary clinics for neuromuscular care and research. *Muscle and Nerve* (2017). doi:10.1002/mus.25725
16. Al-Chalabi, A. & Hardiman, O. The epidemiology of ALS: A conspiracy of genes, environment and time. *Nature Reviews Neurology* (2013). doi:10.1038/nrneurol.2013.203
17. Chiò, A. *et al.* Genetic counselling in ALS: Facts, uncertainties and clinical suggestions. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* (2014). doi:10.1136/jnnp-2013-305546
18. Van Blitterswijk, M. *et al.* Evidence for an oligogenic basis of amyotrophic lateral sclerosis. *Hum. Mol. Genet.* (2012). doi:10.1093/hmg/dds199
19. 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* (2014). doi:10.1038/nn.3584
20. Wang, M. D., Little, J., Gomes, J., Cashman, N. R. & Krewski, D. Identification of risk factors

- associated with onset and progression of amyotrophic lateral sclerosis using systematic review and meta-analysis. *Neurotoxicology* (2017). doi:10.1016/j.neuro.2016.06.015
21. Steele, J. C. & McGeer, P. L. The ALS/PDC syndrome of Guam and the cycad hypothesis. *Neurology* (2008). doi:10.1212/01.wnl.0000312571.81091.26
 22. Bradley, W. G. *et al.* Is exposure to cyanobacteria an environmental risk factor for amyotrophic lateral sclerosis and other neurodegenerative diseases? *Amyotroph. Lateral Scler. Front. Degener.* (2013). doi:10.3109/21678421.2012.750364
 23. Murch, S. J., Cox, P. A., Banack, S. A., Steele, J. C. & Sacks, O. W. Occurrence of β -methylamino-L-alanine (BMAA) in ALS/PDC patients from Guam. *Acta Neurol. Scand.* (2004). doi:10.1111/j.1600-0404.2004.00320.x
 24. Beghi, E. *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis, physical exercise, trauma and sports: Results of a population-based pilot case-control study. *Amyotroph. Lateral Scler.* (2010). doi:10.3109/17482960903384283
 25. Pupillo, E. *et al.* Physical Activity and ALS. A European Population-based, Case-control Study. *Ann Neurol* (2014). doi:10.1002/ana.24150
 26. Ingre, C., Roos, P. M., Piehl, F., Kamel, F. & Fang, F. Risk factors for amyotrophic lateral sclerosis. *Clinical Epidemiology* (2015). doi:10.2147/CLEP.S37505
 27. Rooney, J. P. K. *et al.* A case-control study of hormonal exposures as etiologic factors for ALS in women. *Neurology* (2017). doi:10.1212/WNL.0000000000004390
 28. Yin, J. *et al.* Interactions between plasma copper concentrations and SOD1 gene polymorphism for impaired glucose regulation and type 2 diabetes. *Redox Biol.* (2019). doi:10.1016/J.REDOX.2019.101172
 29. Wang, L., Pytel, P., Feltri, M. L., Wrabetz, L. & Roos, R. P. Selective knockdown of mutant SOD1 in Schwann cells ameliorates disease in G85R mutant SOD1 transgenic mice. *Neurobiol. Dis.* (2012). doi:10.1016/j.nbd.2012.05.014
 30. Muscogiuri, G. *et al.* Genetic disruption of *sod1* gene causes glucose intolerance and impairs b-cell function. *Diabetes* (2013). doi:10.2337/db13-0314
 31. Abu-Hamad, S., Kahn, J., Leyton-Jaimes, M. F., Rosenblatt, J. & Israelson, A. Misfolded SOD1 Accumulation and Mitochondrial Association Contribute to the Selective Vulnerability of Motor Neurons in Familial ALS: Correlation to Human Disease. *ACS Chem. Neurosci.* (2017). doi:10.1021/acscchemneuro.7b00140
 32. Stallings, N. R. *et al.* TDP-43, an ALS Linked Protein, Regulates Fat Deposition and Glucose Homeostasis. *PLoS One* (2013). doi:10.1371/journal.pone.0071793
 33. Chiang, P.-M. *et al.* Deletion of TDP-43 down-regulates *Tbc1d1*, a gene linked to obesity, and alters body fat metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2010). doi:10.1073/pnas.1002176107
 34. Perera, N. D. *et al.* Mutant TDP-43 deregulates AMPK activation by PP2A in ALS models. *PLoS One* (2014). doi:10.1371/journal.pone.0090449
 35. Romano, G. *et al.* Glial TDP-43 regulates axon wrapping, GluRIIA clustering and fly motility by autonomous and non-autonomous mechanisms. *Hum. Mol. Genet.* (2015). doi:10.1093/hmg/ddv330

36. Geser, F. *et al.* Clinical and pathological continuum of multisystem TDP-43 proteinopathies. *Arch. Neurol.* (2009). doi:10.1001/archneurol.2008.558
37. Haeusler, A. R. *et al.* C9orf72 nucleotide repeat structures initiate molecular cascades of disease. *Nature* (2014). doi:10.1038/nature13124
38. Waite, A. J. *et al.* Reduced C9orf72 protein levels in frontal cortex of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal degeneration brain with the C9ORF72 hexanucleotide repeat expansion. *Neurobiol. Aging* (2014). doi:10.1016/j.neurobiolaging.2014.01.016
39. Lim, M. A. *et al.* Reduced Activity of AMP-Activated Protein Kinase Protects against Genetic Models of Motor Neuron Disease. *J. Neurosci.* (2012). doi:10.1523/jneurosci.6554-10.2012
40. H., N. *et al.* Frequent hepatic steatosis in amyotrophic lateral sclerosis: Implication for systemic involvement. *Neurol. Clin. Neurosci.* (2015). doi:10.1111/ncn3.143 LK - <http://limo.libis.be/resolver?&sid=EMBASE&issn=20494173&id=doi:10.1111%2Fncn3.143&atitle=Frequent+hepatic+steatosis+in+amyotrophic+lateral+sclerosis%3A+Implication+for+systemic+involvement&stitle=Neurol.+Clin.+Neurosci.&title=Neurology+and+Clinical+Neuroscience&volume=3&issue=2&spage=58&epage=62&aurlast=Nodera&aufirst=Hiroyuki&aunit=H.&aufull=Nodera+H.&coden=&isbn=&pages=58-62&date=2015&aunit1=H&aunitm=>
41. Desport, J. C. *et al.* Factors correlated with hypermetabolism in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Am. J. Clin. Nutr.* (2001).
42. Huisman, M. H. B. *et al.* Effect of presymptomatic body mass index and consumption of fat and alcohol on amyotrophic lateral sclerosis. *JAMA Neurol.* (2015). doi:10.1001/jamaneurol.2015.1584
43. Pradat, P. F. *et al.* Impaired glucose tolerance in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph. Lateral Scler.* (2010). doi:10.3109/17482960902822960
44. Dupuis, L., Oudart, H., Rene, F., de Aguilar, J.-L. G. & Loeffler, J.-P. Evidence for defective energy homeostasis in amyotrophic lateral sclerosis: Benefit of a high-energy diet in a transgenic mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2004). doi:10.1073/pnas.0402026101
45. Dupuis, L. *et al.* Up-regulation of mitochondrial uncoupling protein 3 reveals an early muscular metabolic defect in amyotrophic lateral sclerosis. *FASEB J.* (2003).
46. 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**, 411–36 (2011).
47. Prokop, A. A rough guide to *Drosophila* mating schemes (version 6.2). *Neuron* (2015). doi:10.1016/j.neuron.2011.09.021
48. Kavi, H. H., Fernandez, H. R., Xie, W. & Birchler, J. A. RNA silencing in *Drosophila*. *FEBS Lett.* **579**, 5940–5949 (2005).
49. Bozzo, F., Mirra, A. & Carri, M. T. Oxidative stress and mitochondrial damage in the pathogenesis of ALS: New perspectives. *Neuroscience Letters* (2017). doi:10.1016/j.neulet.2016.04.065
50. Xia, R. *et al.* Motor neuron apoptosis and neuromuscular junction perturbation are prominent features in a *Drosophila* model of Fus-mediated ALS. *Mol. Neurodegener.* (2012). doi:10.1186/1750-1326-7-10

51. Romano, G. *et al.* Chronological requirements of TDP-43 function in synaptic organization and locomotive control. *Neurobiol. Dis.* (2014). doi:10.1016/j.nbd.2014.07.007