



Universidad
Zaragoza



Facultad de Ciencias
Universidad Zaragoza

Trabajo Fin de Máster

ESTUDIO DE LA DINÁMICA MITOCONDRIAL EN EL MÚSCULO
ESQUELÉTICO DE UN MODELO ANIMAL DE ESCLEROSIS
LATERAL AMIOTRÓFICA

STUDY OF MITOCHONDRIAL DYNAMICS IN SKELETAL MUSCLE
OF AN ANIMAL MODEL OF AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS

Autor/es

Gabriel Rada Rodrigo

Director/es

Rosario Osta Pinzolas

Laura Moreno Martínez

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

Máster en Biología Molecular y Celular
2022/2023

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a las directoras de este trabajo, Laura y Charo, por la confianza depositada en mí y lo mucho que me habéis enseñado. A mis compañeras de LAGENBIO, gracias por acogerme tan bien en el laboratorio. A mis amigos y a Blanca, me dais la vida. Y por supuesto a mi familia y a mis padres, por apoyarme incondicionalmente en todo lo que hago.

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1. Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA).....	3
2.2. El músculo esquelético en la ELA	10
2.3. Implicación de la mitocondria en la ELA.....	12
2.4. La dinámica mitocondrial en la ELA.....	13
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	18
4. METODOLOGÍA	19
4.1. Modelo animal	19
4.2. Extracción y cuantificación de RNA	19
4.3. Síntesis de DNA complementario.....	20
4.4. Optimización de primers	20
4.5. PCR cuantitativa (qPCR).....	20
4.6. Extracción y cuantificación de proteína	22
4.7. Western blot	22
4.8. Análisis estadístico	23
5. RESULTADOS.....	24
5.1. Expresión génica de factores reguladores miogénicos (MRFs) y de la familia de las piruvato deshidrogenasas quinasas (PDK)	24
5.2. Expresión génica y proteica en músculo de los factores implicados en la fusión mitocondrial en los animales SOD1G93A frente a sus controles.....	26
5.3. Expresión génica y proteica en músculo de los factores implicados en la fisión mitocondrial en los animales SOD1G93A frente a sus controles.....	28
5.4. Expresión proteica de factores implicados en la dinámica mitocondrial a lo largo de la enfermedad en ratones SOD1G93A.....	29
5.4.1. Fisión mitocondrial	29
5.4.2. Fusión mitocondrial	30
6. DISCUSIÓN	32
7. CONCLUSIONES.....	40
8. BIBLIOGRAFÍA	42
9. MATERIAL SUPLEMENTARIO	51

ABREVIATURAS

ALSFRS-R: Revisión de la puntuación funcional para la esclerosis lateral amiotrófica

ATP: Adenosina trifosfato

BCA: Ácido bicinconínico

BSA: Albúmina de Suero bovino

C9orf72: Chromosome 9 open reading frame 72

cDNA: DNA complementario

Ct: Ciclo umbral

DNA: Ácido desoxiribonucleico

Drp1: Proteína relacionada con la Dinamina 1

ELA: Esclerosis lateral amiotrófica

ELAe: Esclerosis lateral amiotrófica esporádica

ELAf: Esclerosis lateral amiotrófica familiar

ENCALS: Red europea por la cura de la ELA

FIS1: Proteína de fisión 1

FUS: Fused in sarcoma

Gapdh: Gliceraldehído-fosfato deshidrogenasa

GTPasa: Guanosina trifosfatasa

HRP: Horseradish peroxidase

hSOD1: SOD1 humana

ITGB1: Integrina beta 1

MFF: Factor de fisión mitocondrial

MFN: Mitofusina

MID49/MID51: Proteínas de unión a Drp1 en mamíferos 49/51

miRNA: Micro-RNA

MRFs: Factores reguladores miogénicos

mRNA: RNA mensajero

MyoD1: Factor de diferenciación miogénica

NMJ: Unión neuromuscular

OPA1: Proteína de la atrofia óptica 1

OXPPOS: Fosforilación oxidativa

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PDH: Piruvato deshidrogenasa

PDK: Piruvato deshidrogenasa quinasa

pDRP1: Proteína relacionada con la Dinamina 1 fosforilada

PVDF: Fluoruro de polivinilideno

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

RIPA: Radioimmunoprecipitation assay

RNA: Ácido ribonucleico

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SNC: Sistema nervioso central

SOD1: Superóxido dismutasa 1

TARDBP: Proteína TAR de unión a DNA/RNA

TMEM182: Proteína transmembrana 182

TTBS: Tween-Tris-buffered saline

WT: Wildtype

1. RESUMEN

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa que provoca la pérdida progresiva de motoneuronas superiores e inferiores, conduciendo a la parálisis y atrofia muscular y, en última instancia, al fallecimiento del paciente. Aunque los mecanismos subyacentes no se comprenden completamente, se ha sugerido que la disfunción mitocondrial desempeña un papel crucial. Aunque numerosos estudios han investigado esta alteración en el sistema nervioso, se sabe menos acerca de cómo afecta esta disfunción a la fisiología del músculo esquelético.

El objetivo de este trabajo es estudiar la dinámica mitocondrial en el músculo esquelético del modelo animal de ELA SOD1G93A, mecanismo que se encarga de mantener la morfología y funcionalidad de la red mitocondrial celular. Para ello, se estudió la expresión génica y proteica de las principales moléculas involucradas en los mecanismos de la dinámica mitocondrial. Además, se comprobaron a nivel transcriptómico la existencia de alteraciones musculares y mitocondriales en el músculo esquelético del modelo.

Los resultados revelan una desregulación de la dinámica mitocondrial y mostraron una hiperactivación de las moléculas responsables de la fisión mitocondrial en el músculo esquelético del modelo de ELA SOD1G93A. Estos hallazgos sugieren que esta disfunción mitocondrial podría contribuir a la progresión de la enfermedad, empeorando la patogenia de la ELA. Además, plantean la posibilidad de que la dinámica mitocondrial pueda ser un objetivo terapéutico para el tratamiento de la enfermedad.

ABSTRACT

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease that causes progressive loss of upper and lower motor neurons, leading to paralysis and muscle atrophy and, ultimately, death. Although the underlying mechanisms are not fully understood, it has been suggested that mitochondrial dysfunction plays a crucial role. Although numerous studies have investigated this alteration in the nervous system, less is known about how this dysfunction affects skeletal muscle physiology.

The aim of this work is to study the mitochondrial dynamics in skeletal muscle of the ALS animal model SOD1G93A, a mechanism responsible for maintaining the morphology and functionality of the cellular mitochondrial network. To this end, gene and protein expression of the main molecules involved in the mechanisms of mitochondrial dynamics were studied. In addition, the existence of muscular and mitochondrial alterations in the skeletal muscle of the model was verified at the transcriptomic level.

The results reveal a dysregulation of mitochondrial dynamics and showed a hyperactivation of the molecules responsible for mitochondrial fission in the skeletal muscle of the ALS model SOD1G93A. These findings suggest that this mitochondrial dysfunction may contribute to disease progression, worsening the pathogenesis of ALS. Furthermore, they raise the possibility that mitochondrial dynamics may be a therapeutic target for disease treatment.

2. ANTECEDENTES

2.1. Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA)

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa descrita por primera vez en 1869 por el neurólogo francés Jean-Martin Charcot. Se considera una de las enfermedades más graves de la motoneurona y forma parte de las tres principales enfermedades neurodegenerativas junto con el Alzheimer y el Parkinson. La ELA causa una degeneración progresiva y rápida del sistema neuronal motor y de la musculatura esquelética, afectando tanto a las motoneuronas superiores como inferiores y causando un endurecimiento de las columnas laterales de la médula espinal y una atrofia muscular acompañada de debilidad y fasciculaciones (1). Esta enfermedad suele progresar hasta causar la muerte del paciente, generalmente debido a un fallo respiratorio, en una media de 3 a 5 años desde el inicio de los síntomas.

La incidencia de la ELA en el mundo es de 1,75 por cada 100.000 personas por año, siendo un poco más alta en hombres (2). En Europa la incidencia es de 2,20 casos por cada 100.000 individuos y la prevalencia es de 5,40 casos por cada 100.000 (3). A su vez, en la población española, la incidencia es de 1 por cada 50.000 y la prevalencia de 1 por cada 100.000 (1). Está demostrado que la incidencia en la enfermedad es diferente según el origen ancestral y la zona geográfica, debido a genes concretos y factores ambientales (3).

Etiología

En cuanto a la etiología, el 90-95 % de los casos de ELA son de causa desconocida y se corresponden con la ELA esporádica (ELAE). Solo un 5-10 % se corresponden con la ELA familiar (ELAF), que es hereditaria y se debe a mutaciones conocidas (4).

En 2013, se descubrió una de las causas genéticas más frecuentes de la ELA familiar, que es una expansión repetida en el gen *C9orf72* ligado al cromosoma 9p21 (5). Hasta la fecha, se han descrito mutaciones en al menos 22 genes relacionados con la ELA, siendo los más frecuentes *C9orf72*, el gen codificante para la superóxido dismutasa 1 (*SOD1*), *FUS* (fused in sarcoma) y el gen que codifica para la proteína TAR de unión a DNA/RNA (*TARDBP/TDP43*) (6).

La mutación del gen de la *SOD1* es responsable de aproximadamente el 20 % de los casos de ELAF y resulta en un fallo en la función de la enzima antioxidante citosólica superóxido

dismutasa 1 (SOD1), lo que a su vez provoca un aumento en los radicales libres tóxicos para las células. Pero no es la falta de actividad de la enzima la que causa la enfermedad, sino la formación de agregados, que afecta diversos procesos celulares (5, 6). El descubrimiento de esta mutación, que fue la primera descrita en la enfermedad, permitió el desarrollo del primer modelo murino de ELA ratón transgénico SOD1G93A, portador del gen humano *SOD1* mutado en el que la glicina 93 se ha cambiado por una alanina (9), expresando esta proteína mutada en todos los tipos celulares, incluyendo en estos tanto neuronas como células musculares. Estos ratones experimentan mecanismos patogénicos similares a los de la ELA en el ser humano, que conducen al desarrollo de una neurodegeneración rápida y progresiva, aunque existe cierta heterogeneidad en el fenotipo dependiente del número de copias del transgén, del fondo genético de la cepa y del sexo del animal (8, 9, 10, 11). Se trata del modelo utilizado en este trabajo y actualmente es el mejor caracterizado para estudiar la ELA *in vivo*, siendo muy útil en el estudio de la enfermedad y la búsqueda de estrategias terapéuticas en humanos debido a que desarrolla un fenotipo y patología similares a los humanos (14).

Por otra parte, la etiología de la ELA esporádica sigue siendo desconocida, aunque se han identificado mutaciones en diferentes genes en pacientes con ELA esporádica y algunos de ellos coinciden con la ELA familiar (15). La enfermedad se considera multifactorial, y cada vez hay más hipótesis que apuntan a que la combinación de distintos factores puede llevar al desarrollo de esta. Además, se ha relacionado la ELA esporádica con la exposición a factores ambientales de riesgo como el humo del tabaco y la exposición a químicos (16, 17, 18).

Patogenia

La pérdida selectiva y degeneración de motoneuronas es la principal característica patológica de la ELA. Existen dos hipótesis principales sobre el proceso de degeneración de la motoneurona en la ELA: la hipótesis de "*dying-forward*", que propone que la ELA es principalmente un trastorno de la neurona motora cortical (19) y la teoría de "*dying-back*", que sugiere que la degeneración de las motoneuronas comienza distalmente y progresa hacia el soma (20). Actualmente, la teoría de "*dying-back*" es aceptada por la comunidad científica y como soporte a esta, se ha demostrado que la degeneración temprana de la placa motora o unión neuromuscular (NMJ) precede a la pérdida de neuronas en la médula espinal en ratones transgénicos con la *SOD1* humana mutada (21, 22). Aunque no se conocen los mecanismos moleculares precisos que provocan la muerte de estas células, hay diversas hipótesis, como

alteraciones en el funcionamiento del RNA y en el procesamiento de proteínas anómalas, excitotoxicidad, estrés oxidativo, alteraciones mitocondriales, activación glial o neuroinflamación, y daño en el transporte axonal (1, 23) .

Los mecanismos más relevantes implicados en la patogenia de la ELA se muestran en la Figura 1. A continuación, se describen brevemente:

- Excitotoxicidad mediada por glutamato:

El glutamato es el neurotransmisor más importante del sistema nervioso central (SNC). Su función tras ser liberado consiste en la interacción con los receptores postsinápticos para estimular la excitación. Pero también es muy importante su recaptación, mediante los transportadores de recaptación de glutamato, que eliminan el neurotransmisor para que cesen los estímulos excitatorios (24). Si este mecanismo de recaptación se encuentra alterado puede producirse una excesiva estimulación de los receptores de glutamato, produciendo una lesión neuronal denominada excitotoxicidad. Esta lesión cursa con una alteración de la homeostasis del calcio y las motoneuronas son especialmente sensibles a esta toxicidad inducida por la entrada de calcio debido a la acumulación excesiva de glutamato (25).

- Desregulación de la homeostasis proteica:

La acumulación de agregados proteicos y los defectos en las vías de degradación proteica son uno de los hallazgos más importantes en la enfermedad. De los genes anteriormente nombrados, SOD1 forma frecuentemente agregados proteicos intracelulares (26), mutaciones en el gen *TDP-43* también están asociadas con la formación de agregados proteicos intracelulares (27), así como las mutaciones en el gen *FUS* (28). Estas mutaciones conllevan la traducción de estas proteínas mal plegadas, con su consecuente agregación y localización en lugares celulares anormales.

- Daño en el transporte axonal:

Este proceso, dependiente del ATP, es crucial para el transporte de componentes celulares esenciales como RNA, proteínas y orgánulos, tanto a las terminaciones axonales como al soma celular de las neuronas. Se han observado, en estadios tempranos de la ELA, alteraciones en este transporte axonal (29), que parecen ser debidas a mutaciones en los genes codificantes de proteínas involucradas en estos procesos (30).

- Disfunción mitocondrial:

La función de las mitocondrias es crucial para el mantenimiento celular: producción de ATP, homeostasis del calcio celular, participación en el metabolismo intermediario, además de su involucración en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y en las vías apoptóticas. Tienen así especial importancia en las motoneuronas y en el músculo, los principales afectados por la enfermedad, debido a la alta carga metabólica que tienen y su consecuente dependencia de la fosforilación oxidativa. Son, por ello, muy vulnerables a la pérdida de función mitocondrial y esta disrupción funcional puede conducir al fracaso bioenergético, estrés oxidativo y apoptosis (31). Se han visto, tanto en pacientes como en modelos de ELA, cambios morfológicos y funcionales de la mitocondria, como se describe en profundidad más adelante.

- Desregulación del tráfico endosomal:

La endocitosis es un proceso celular mediante el cual las células incorporan moléculas del ambiente extracelular envolviéndolas en una invaginación de la membrana plasmática que forma una vesícula intracelular. El transporte de estas vesículas hasta su destino se denomina tráfico endosomal y se trata de un mecanismo complejo con diferentes orgánulos y factores implicados (32). Algunos de los genes en los que se han encontrado mutaciones en pacientes con ELA, como *TDP43* y *C9orf72*, participan en la regulación del tráfico endosomal o su mutación da lugar a una alteración en el tráfico endosomal (33, 34).

- Procesamiento aberrante del RNA:

La patogénesis de la ELA se caracteriza por la alteración del procesamiento del RNA mensajero (mRNA). Cuatro de los genes que con mayor frecuencia presentan mutaciones en la ELA: *SOD1*, *TARDBP*, *FUS* y *C9orf72*, están involucrados en diferentes procesos del metabolismo del RNA, incluyendo la transcripción, el transporte y la estabilización del RNA, el splicing alternativo y la biogénesis de micro-RNA (miRNA) (35). Así, estas mutaciones que se han identificado en pacientes con ELA, provocan la disfunción de las proteínas que codifican y el fallo en el procesamiento de los RNAs en los que están implicados.

- Disfunción en la reparación DNA:

El DNA se puede dañar de diferentes formas, por ejemplo, debido a una excesiva producción de ROS, mecanismo al cual las neuronas son especialmente sensibles. Además, se han identificado mutaciones en varios genes relacionados con la reparación del DNA en la ELA (36).

- Estrés oxidativo:

Cuando se genera un desequilibrio entre la generación y los mecanismos de eliminación de radicales libres se produce estrés oxidativo, que puede generar daños irreparables en la célula. Se han detectado marcadores de daño por radicales libres en pacientes de ELA (37), además de haberse observado un incremento en los niveles de oxidación de diferentes mRNA en el modelo animal de ELA con la hSOD1 mutada (24). Además de causar daño directamente, el estrés oxidativo actúa promoviendo otros mecanismos que contribuyen al daño celular.

- Neuroinflamación:

Conforme avanza la enfermedad se ha visto una respuesta neuroprotectora caracterizada por la activación de la microglía, infiltración de linfocitos T y superproducción de citoquinas (38) que pasa a ser citotóxica por la liberación de factores tóxicos como los ROS y citoquinas proinflamatorias, causando daño a la motoneurona (39).

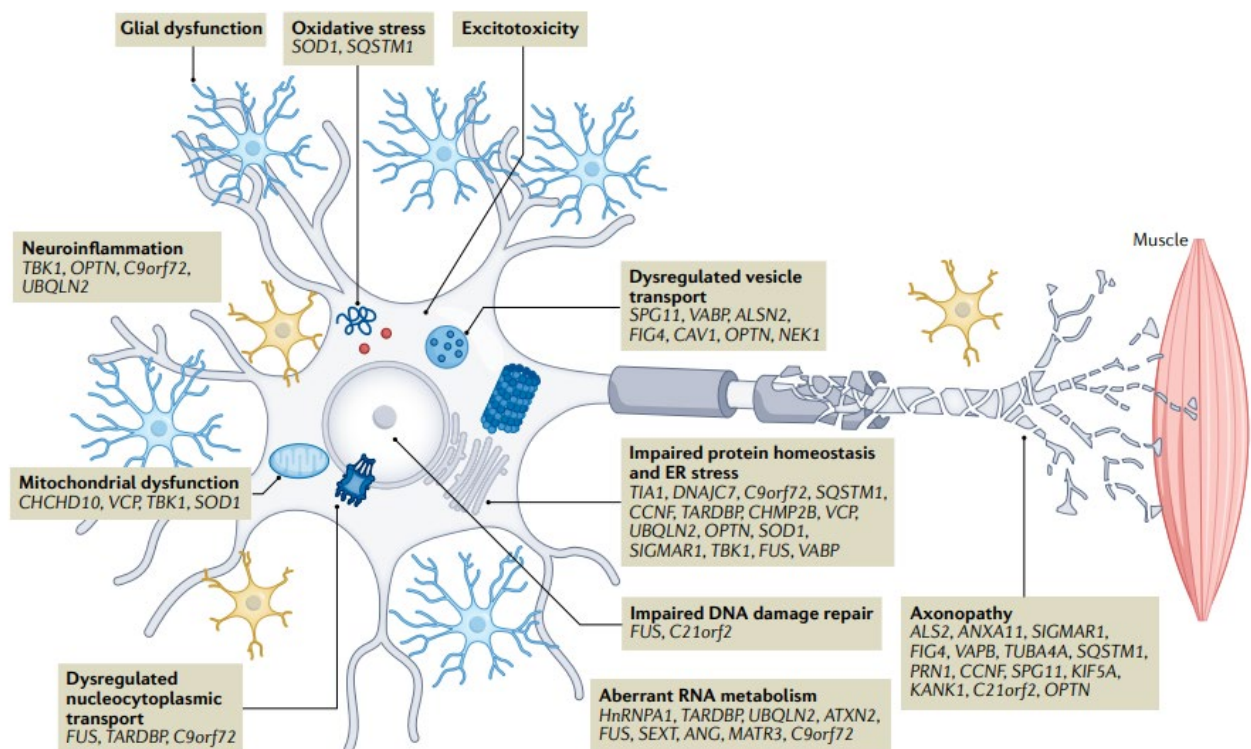


Figura 1. Mecanismos patológicos y genes implicados en la ELA (40).

Sintomatología

Los rasgos clínicos característicos de la ELA se resumen en una debilidad y atrofia muscular progresiva. En cuanto a la duración, suele ser bastante corta, de entre 2 y 5 años después del inicio de los síntomas para la mayoría de los pacientes, produciéndose el fallecimiento, en la mayor parte de los casos, debido al fallo de los músculos respiratorios. La edad a la que se manifiesta puede variar según sea un caso de ELAe o ELAf, siendo la media de inicio de la enfermedad de 56 y 46 años, respectivamente. Aunque también se han descrito formas juveniles e infantiles de la enfermedad, con un inicio más temprano de los síntomas (1).

Los síntomas que presenta cada paciente dependen la región neurológica afectada. El inicio de los síntomas suele presentarse en las extremidades en la mayoría de los pacientes, aunque también hay casos que tienen un inicio bulbar o incluso primeros síntomas respiratorios. Cuando se trata de un inicio bulbar los pacientes presentan disfagia y disartria, viéndose afectadas la motoneurona superior y/o la inferior. En el inicio cervical, que está asociado con síntomas de las extremidades superiores, se ven afectadas las motoneuronas superiores y/o inferiores. Y cuando se trata de un inicio lumbar, suele haber fasciculación y debilidad y está relacionado con las motoneuronas inferiores (16).

Diagnóstico y pronóstico

El diagnóstico de la esclerosis lateral amiotrófica es complicado debido a su heterogeneidad en la presentación clínica y el solapamiento de los síntomas con otros trastornos neurológicos, lo que hace que el diagnóstico definitivo se retrase notablemente tras el inicio de los síntomas. El diagnóstico temprano de la enfermedad es de suma importancia ya que puede mejorar la progresión de la enfermedad facilitando las intervenciones oportunas que puedan ralentizar la progresión de la enfermedad (23).

No existe una prueba diagnóstica específica de la enfermedad por lo que el diagnóstico se basa en los datos clínicos y se confirma o descarta con pruebas complementarias como la electromiografía, además de a base de exclusión de otras situaciones o enfermedades cuyos síntomas solapan con la enfermedad. Así, se han instaurado unos criterios internacionales, los "Criterios de El Escorial" (1994), los cuales han sido revisados y modificados en los criterios de "Airlie House" (2000) y de "Awaji-Shima" (2008) (41). Estos criterios clasifican el grado de "certeza diagnóstica" desde ELA posible, a probable, a definitiva; mediante evaluación clínica,

en función del número de segmentos afectados combinados con hallazgos electrofisiológicos. Lo cierto es que el uso de estos criterios para el diagnóstico pueden retrasarlo, además de confundir a los pacientes y sus familias (42). Para corregir estas limitaciones, se han reconsiderado los criterios para mejorar el diagnóstico en las primeras fases de la enfermedad, llegando a los criterios de “Gold Coast” (2015), que redefinen el diagnóstico de la esclerosis lateral amiotrófica (43). La adopción de estos criterios simplificados abandona las categorías diagnósticas anteriores facilitando el diagnóstico precoz y definitivo (44). En caso de presencia de antecedentes familiares, se realizan análisis genéticos para confirmar una posible ELAf.

En cuanto al pronóstico, también existe una falta de métodos que permitan predecir de manera fiable el curso probable de la enfermedad. Clínicos e investigadores confían actualmente en la revisión de la puntuación funcional para la esclerosis lateral amiotrófica (ALSFRS-R) (45), un sistema de puntuación que mide el ritmo de progresión de la enfermedad, aunque con muchas limitaciones, por lo que se están introduciendo nuevos métodos como sistemas de clasificación o el sistema de supervivencia de ENCALs, que combina diversas predicciones para definir diversos grupos de supervivencia (44, 46).

En definitiva, tanto el diagnóstico como el pronóstico actual se basa en una aproximación integrada basada en la historia clínica, examen físico y pruebas complementarias, con una prueba genética en algunos casos. Así, comprender el espectro de presentaciones clínicas y solapamiento con otras enfermedades, combinado con el descubrimiento de nuevos métodos diagnósticos y biomarcadores, que actualmente no existen validados para uso clínico, agilizaría el diagnóstico en un futuro.

Tratamiento

Aunque existen muchas teorías sobre la causa de la enfermedad, actualmente no hay cura para la enfermedad de ELA y el tratamiento es solo paliativo. Aunque se han investigado muchos fármacos, solo cuatro han sido aprobados hasta la fecha: riluzol, edaravone, tofersen y relyvrio (47). El riluzol actúa como antagonista del glutamato y puede prolongar la vida de algunos pacientes hasta 2-3 meses. Edaravone, por otro lado, mejora la movilidad en algunos pacientes, especialmente si se administra temprano en la enfermedad. Edaravone tiene un efecto antioxidante al eliminar peróxidos lipídicos y radicales hidroxilos (16). Tofersen es un oligonucleótido antisentido que disminuye la síntesis de SOD1 y se usa para tratar ELA

asociado con una mutación en la SOD1 (48). Por último, relyvrio es una combinación de dos fármacos que actúan bloqueando las señales de estrés en las células, previniendo la muerte de las células nerviosas (49).

Actualmente hay en curso diversos ensayos clínicos en los que se están estudiando otras terapias.

2.2. El músculo esquelético en la ELA

Todavía está en debate si la enfermedad es exclusivamente consecuencia de la degeneración de la motoneurona o si, por el contrario, también contribuyen mecanismos patológicos procedentes del músculo esquelético u otros tejidos periféricos.

La hipótesis que explica esta degeneración y que actualmente está aceptada por la comunidad científica es la teoría de "*dying-back*", que sugiere un inicio de la degeneración de las motoneuronas en el terminal nervioso o en la placa motora y una progresión hacia el soma (50, 51). Así, la ELA se cataloga como una "axonopatía distal" donde, tanto en el modelo SOD1G93A, como en casos clínicos humanos, la placa motora y el axón se ven afectados con anterioridad a la pérdida significativa de cuerpos neuronales y el inicio de la atrofia muscular (52). Cada vez hay más estudios con modelos animales que evidencian que en los estadios iniciales de la enfermedad empieza a haber defectos en la unión neuromuscular (52, 53, 54) y que la patología avanza a lo largo de los axones hasta el cuerpo celular de la motoneurona para finalizar con la muerte de ésta, de ahí el nombre "*dying-back*". Esto se ha demostrado con la expresión de la proteína SOD1 mutada únicamente en neuronas motoras, ya que no es suficiente para causar sintomatología típica de la ELA (55) (56). Esto refleja la contribución de las células no neuronales, incluidas las células gliales y el músculo esquelético, a la degeneración de la motoneurona, en concordancia con numerosos estudios que indican que las alteraciones en múltiples tipos de células actúan de forma sinérgica para exacerbar la enfermedad (57). De ahí el importante papel que ejerce el músculo esquelético en esta enfermedad, ya que es posible que defectos musculares intrínsecos en fases tempranas de la enfermedad favorezcan o contribuyan a esta retracción axonal.

Como se ha nombrado anteriormente, no se conocen los mecanismos moleculares que provocan la muerte de las motoneuronas, pero sí que hay diversas hipótesis que señalan a

alteraciones mitocondriales, alteraciones en el funcionamiento del RNA y en el procesamiento de proteínas anómalas y estrés oxidativo, entre otros (22, 23, 30).

Cuando se habla de daño y mantenimiento del músculo esquelético son clave las células satélite musculares. Éstas son las encargadas de, tras recibir señales del entorno como una lesión, ejercicio físico o denervación muscular, salir del estado de quiescencia en el que se encuentran y activarse, promoviendo su actividad miogénica que consiste en la proliferación y diferenciación para proporcionar la suficiente progenie de cara a una regeneración muscular efectiva (58). En esta regeneración tienen gran importancia los conocidos como factores reguladores miogénicos (MRFs), que se encargan de inducir la expresión de genes clave para la diferenciación muscular. Algunos de estos MRFs son la miogenina y el factor de diferenciación miogénica 1 (MyoD1) (59, 60). Otra proteína importante en la función, regeneración y señalización celular en el músculo es la integrina beta 1 (ITGB1), un receptor transmembrana que desempeña una función tanto estructural como reguladora en procesos importantes para el músculo (61). Recientemente se ha descrito la proteína transmembrana 182, (TMEM182), regulada a nivel transcripcional por MyoD1, que retrasa la regeneración muscular regulando negativamente a la ITGB1 (62). A pesar de que los MRFs sí que se han estudiado en la ELA, se desconoce el papel de ITGB1 y de TMEM182 en esta enfermedad.

Desde hace tiempo se sabe que en el músculo esquelético de la ELA existe un deterioro de la actividad de las células satélite y de su potencial miogénico. En concreto, en el modelo animal SOD1G93A, nuestro grupo ha descrito que hay un aumento progresivo de los transcritos de Pax7 y MRFs (MyoD1 y miogenina), genes indicadores de un daño muscular, en el músculo esquelético (63). Además, en las células satélite de estos animales se observó una menor capacidad proliferativa a partir de estadios presintomáticos de la enfermedad (64).

La elevada demanda energética necesaria tanto para la contracción como para la regeneración muscular se satisface con la producción de energía por parte de las mitocondrias, que ocupan entre el 10 y el 15 % del volumen de la fibra muscular (65). Además, la disfunción mitocondrial en el músculo esquelético se ha relacionado con numerosas enfermedades metabólicas como la diabetes y la obesidad, así como con el envejecimiento y otras patologías musculares (66).

2.3. Implicación de la mitocondria en la ELA

En cuanto a alteraciones mitocondriales en la ELA, cada vez hay más estudios que apuntan a la disfunción mitocondrial como un factor clave en la patogenia de esta enfermedad (67). Diversos estudios han encontrado anomalías en la morfología mitocondrial, la bioenergética, la homeostasis del calcio, el transporte y la dinámica de los orgánulos tanto en tejido nervioso como en músculo esquelético de pacientes con ELA (68, 69, 70, 71).

Además de su capacidad para producir ATP, las mitocondrias desempeñan un papel esencial en el metabolismo intermediario y en el mantenimiento de la homeostasis del calcio celular. Las mitocondrias son también la principal fuente de ROS y están involucradas en las vías apoptóticas intrínsecas. En consecuencia, la disfunción mitocondrial puede conducir al fracaso bioenergético, al estrés oxidativo y a la apoptosis (67). Se ha detectado una deficiencia de la cadena respiratoria en pacientes con ELA y se sabe que un sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) ineficiente puede generar ROS, que a su vez pueden dar lugar a estrés oxidativo y deterioro de la función mitocondrial (72). Además, se han observado cambios metabólicos en el músculo esquelético previos a los síntomas motores en la enfermedad, demostrando que la alteración en el equilibrio energético desempeña un papel clave en la progresión de la ELA (73). La mitocondria está altamente implicada en este mantenimiento de la homeostasis energética mediante diferentes mecanismos, entre otros, el ciclo de Randle, que regula la obtención de energía mediante el metabolismo de los ácidos grasos y la glucosa en las células (74). Un mecanismo clave en el ciclo de Randle es la inhibición de la piruvato deshidrogenasa (PDH) mediante la piruvato deshidrogenasa quinasa (PDK), que disminuye la glucólisis en la mitocondria y promueve la oxidación de ácidos grasos (75). Tanto en pacientes como en modelos animales de ELA se ha visto un desequilibrio en esta regulación que contribuye a esta alteración del metabolismo energético que existe en la enfermedad (76, 77).

La alta carga metabólica de las motoneuronas y su consecuente dependencia de la fosforilación oxidativa las hacen particularmente vulnerables a la pérdida de la función mitocondrial. Tanto en pacientes como en modelos animales de ELA con la SOD1 humana mutada se han observado cambios morfológicos de la mitocondria, desencadenando un mal funcionamiento de ésta (78). Por ejemplo, en modelos animales se han observado agregados de SOD1 en el espacio intermembranoso de la mitocondria, lo que conlleva a una peor captación de proteínas (79). Además, también se han observado en pacientes y modelos

animales defectos en la cadena respiratoria y fallos en el transporte axonal de mitocondrias (80) (81). Por otro lado, también se ha visto comprometida la función mitocondrial en casos de ELA hereditaria con mutaciones en *FUS* y *TDP43*, así como en casos de ELA esporádica (82).

En células extraídas de pacientes con ELA tanto el potencial de membrana mitocondrial como la actividad de los complejos de la cadena respiratoria se encuentran disminuidos tras detectar cambios en la morfología mitocondrial. En el modelo de ratón transgénico SOD1G93A y en otros modelos celulares, cuando la morfología mitocondrial es defectuosa, se observa una disminución de los niveles de ATP, una alteración del Ca^{2+} y un aumento de la generación de ROS (83).

Estos estudios sobre los defectos morfológicos mitocondriales afectan directa o indirectamente a la función mitocondrial y confirman la hipótesis de que en la ELA existe esta disfunción mitocondrial.

2.4. La dinámica mitocondrial en la ELA

Un proceso menos estudiado en la ELA es la dinámica mitocondrial. Las mitocondrias son orgánulos morfológicamente muy dinámicos que se remodelan constantemente mediante procesos de fusión y fisión (Figura 2). El equilibrio entre estos dos procesos opuestos regula el número, tamaño y posición de las mitocondrias en el citoplasma, y se denomina "dinámica mitocondrial" (84). Así, se modula activamente la morfología de las mitocondrias para crear una red tubular, que sirve para responder a las necesidades bioenergéticas celulares y llevar a cabo la amplia función mitocondrial, en coordinación con el metabolismo y los mecanismos de control de calidad.

La fisión mitocondrial se caracteriza por la división de una mitocondria en dos mitocondrias hijas, mientras que la fusión mitocondrial es la unión de dos mitocondrias dando lugar a una única mitocondria. La maquinaria central encargada de estos procesos son grandes proteínas GTPasas que pertenecen a la familia de las dinaminas. Estas enzimas pueden oligomerizar y cambiar de conformación para promover la constricción, escisión y/o fusión remodelando así la membrana mitocondrial para obtener diferentes morfologías en respuesta a diversas señales (85).

La fisión mitocondrial se lleva a cabo mediante el reclutamiento de la proteína GTPasa relacionada con la Dinamina 1 (DRP1) en los sitios de constricción mitocondrial por adaptadores como el factor de fisión mitocondrial (MFF), las proteínas de dinámica mitocondrial (MID49/MID51) y a través de la proteína de fisión 1 (FIS1). A este reclutamiento le sucede la oligomerización de DRP1, que causa la constricción de la membrana externa mitocondrial y que conduce al reclutamiento de Dinamina 2 para terminar la escisión de la membrana. En cuanto a la constricción de la membrana mitocondrial interna, se ha propuesto como un proceso independiente regulado por la afluencia de calcio.

Por otra parte, la fusión mitocondrial es impulsada por las proteínas GTPasas de la membrana externa, por la mitofusina (MFN) 1 y 2, que se encargan de la fusión de la membrana mitocondrial externa, seguida de la fusión de la membrana interna, mediada por una proteína que se encuentra en dicha membrana, la atrofia óptica (OPA1) (86).

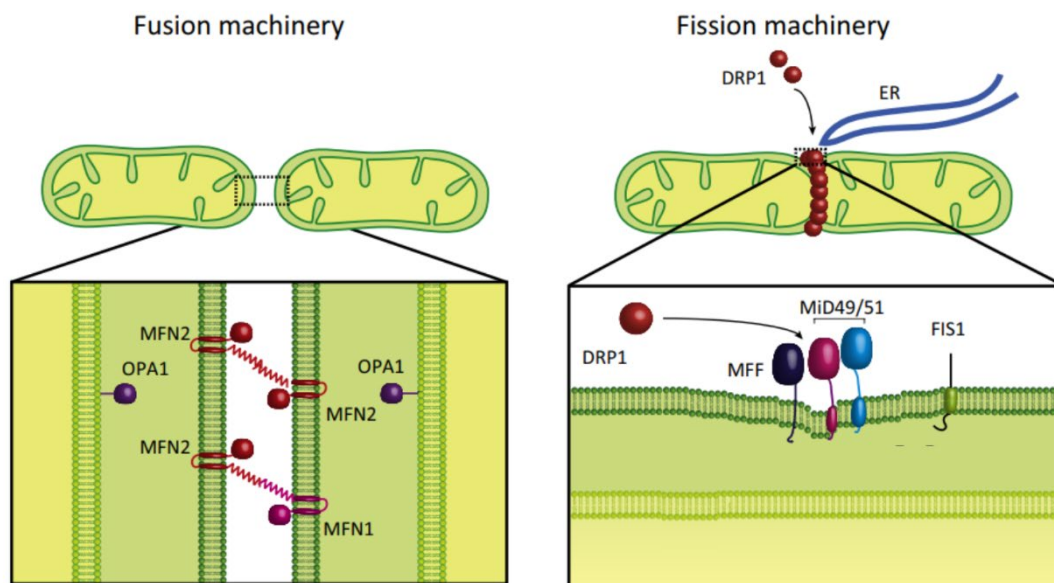


Figura 2. Maquinaria implicada en la dinámica mitocondrial (adaptado de (84)). La fusión se lleva a cabo por interacciones entre MFN1 y MFN2 en la membrana externa mitocondrial y OPA1 en la membrana interna mitocondrial. Para la fisión, DRP1 se recluta en la membrana externa mitocondrial mediante diferentes receptores como FIS1, MFF y MiD49/59 en sitios marcados por el retículo endoplasmático (ER).

Existen además otros factores involucrados en la regulación de la dinámica mitocondrial como la composición lipídica de la membrana o modificaciones post-transcripcionales de los componentes anteriormente nombrados. Una de las modificaciones post-transcripcionales más estudiada es la fosforilación de Drp1 en el residuo 616, que activa la forma pro-fisión de la proteína, estimulando la oligomerización de ésta e induciendo la fisión mitocondrial (87).

Una maquinaria de fisión mitocondrial que funcione eficazmente permite la segregación adecuada de los componentes disfuncionales de la red mitocondrial y facilita su degradación a través de la autofagia (88, 89). Aunque una excesiva fisión provoca la fragmentación mitocondrial, que generalmente se asocia a disfunción metabólica y enfermedad (Figura 3).

Por otro lado, y aunque todavía se encuentre en debate, una red mitocondrial fusionada permitiría la distribución de componentes de la matriz y la estimulación de la actividad OXPHOS. La fusión mitocondrial confiere una estructura elongada y una fusión excesiva da lugar a una red hiperfusionada, que sirve para contrarrestar las alteraciones metabólicas, preservar la integridad celular y proteger frente a la autofagia, por lo que está asociada a mecanismos de supervivencia celular (84, 90).

Así, la desregulación de estos procesos englobados como dinámica mitocondrial, pueden dar lugar a una red fragmentada caracterizada por un gran número de pequeñas mitocondrias o a una red hiperfusionada con mitocondrias alargadas y muy conectadas (86).

Estos diferentes estados morfológicos mitocondriales se asocian a múltiples condiciones fisiológicas y fisiopatológicas. De hecho, se han encontrado mutaciones patógenas en los genes correspondientes a la maquinaria de fisión (Drp1 (91), Dnm2 (92), MFF (93)), de fusión (Mfn2 (94) y OPA1 (95, 96)) y otros factores involucrados en estos procesos.

En relación a la dinámica mitocondrial y la ELA, se ha demostrado que hay una hiperactivación de la fisión mitocondrial mediada por la proteína DRP1 en fibroblastos de pacientes de ELA familiar y en cultivos celulares de motoneuronas (97). Además, en el modelo animal SOD1G93A también se ha observado que la expresión proteica de DRP1 fosforilado está disminuida en la médula espinal (98), lo que sugiere que la dinámica mitocondrial está alterada en el tejido nervioso.

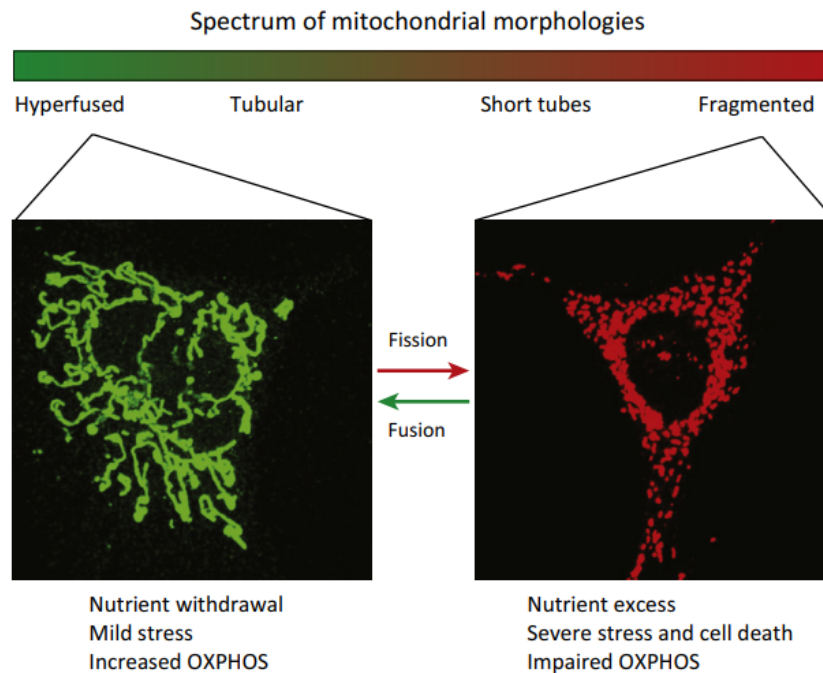


Figura 3. Conexión del metabolismo con la morfología mitocondrial (84). OXPHOS: fosforilación oxidativa.

Sin embargo, apenas se ha estudiado este proceso en el músculo esquelético en esta enfermedad, tan solo un único estudio llevado a cabo en el modelo animal SOD1G93A ha observado que la dinámica mitocondrial está alterada antes de que se desarrollen los signos clínicos de la enfermedad (99).

Por otro lado, en relación con el músculo esquelético y la dinámica mitocondrial, hay un estudio reciente que demuestra que el proceso de fisión mitocondrial en este tejido es indispensable para proporcionar suficiente cantidad de células satélite durante el proceso de regeneración muscular, a través de dos procesos principales: la fosforilación oxidativa mitocondrial y la mitofagia (88). En este mismo estudio se ha observado que cuando se produce una lesión en el músculo esquelético existen ciertos escenarios en los cuales el proceso de fisión mitocondrial no funciona adecuadamente y, en consecuencia, es incapaz de inducir la proliferación de las células satélite musculares para que puedan reparar ese daño en el músculo. Este trabajo ha demostrado que este mecanismo falla en el envejecimiento, y apunta a enfermedades como la sarcopenia.

En resumen, la dinámica mitocondrial en la ELA se ha estudiado ampliamente en tejido nervioso (97, 100, 101), pero apenas se conoce cómo se encuentra dicho mecanismo en el músculo esquelético ni tampoco se ha estudiado su posible papel en la proliferación de las células satélite musculares. Por ello, en este trabajo se pretende realizar una primera aproximación para caracterizar los procesos de fusión y fisión mitocondrial en el músculo esquelético del modelo animal SOD1G93A con el fin de averiguar si la alteración de dicho proceso tiene alguna implicación en la ELA.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Dado que en la ELA existe una disfunción mitocondrial, así como una atrofia muscular progresiva en la cual las células satélite musculares están alteradas, es posible que la alteración de la dinámica mitocondrial en el músculo pueda estar influyendo en la regeneración muscular del músculo dañado. De confirmarse dicha hipótesis, la modulación de este mecanismo podría convertirse en una diana terapéutica para esta enfermedad.

Por tanto, el objetivo general de este trabajo fin de máster es estudiar los mecanismos de la fusión y la fisión mitocondrial en el músculo esquelético en el modelo animal SOD1G93A. Para conseguir este objetivo general, se llevaron a cabo los siguientes objetivos específicos:

1. Confirmar a nivel transcripcional que existe una alteración en los factores reguladores miogénicos (MRFs) así como en la regulación de la función mitocondrial en el músculo esquelético del modelo animal SOD1G93A.
2. Evaluar la modificación de la fusión y fisión mitocondrial en el músculo esquelético de animales SOD1G93A respecto a sus controles.
3. Determinar la modificación de las moléculas clave relacionadas con la dinámica mitocondrial en el músculo esquelético del modelo animal SOD1G93A a lo largo de la enfermedad.

4. METODOLOGÍA

4.1. Modelo animal

El modelo animal empleado ha sido el ratón transgénico SOD1G93A de alta copia, que sobreexpresa la superóxido dismutasa 1 humana (hSOD1) mutada, con un cambio de glicina por alanina en el codón 93; con fondo genético de la cepa B6SJL (B6SJL-Tg (SOD1G93A)1 Gur/J) proveniente de la casa comercial The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). Se utilizaron ratones hemicigóticos SOD1G93A en los siguientes días de vida: 40 días (P40), que coincide con el estadio presintomático de la enfermedad y 120 días (P120), edad correspondiente al estadio terminal. También se utilizaron ratones homocigotos sin el transgén en las mismas edades, siendo estos los empleados como controles o *wildtype* (WT).

Para el diseño experimental se consideró que en cada grupo hubiera hermanos de camada, y se balancearon los sexos para tener en cuenta el posible sesgo en función del sexo.

Los animales fueron alojados en el animalario del Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA). Se siguieron las directrices del RD 53/2013, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, y que transpone la directiva europea 2010/63/UE. Además, todos los procedimientos llevados a cabo han sido aprobados por el Comité Ético para Animales de Experimentación de la Universidad de Zaragoza (PI46/22).

4.2. Extracción y cuantificación de RNA

Se realizó la extracción del RNA del cuádriceps del modelo animal SOD1G93A y sus controles. Cada muestra de tejido se dividió en dos partes iguales. La primera mitad de las muestras, que se empleó para la extracción de RNA, procedía de ratones WT de 40 días (n = 8) y de 120 días de edad (n = 8); y ratones SOD1G93A de 40 días (n = 8) y de 120 días (n = 8). Para llevar a cabo la extracción, el tejido almacenado y congelado a -80 °C, se añadió a un tubo con el reactivo TRIzol Reagent (Ambion). Posteriormente se disgregó en un aparato: Tissue Lyser LT (Qiagen), que lisa el tejido hasta quedar homogeneizado con el trizol. A continuación, se extrajo el RNA usando el kit Direct-zol™ RNA MiniPrep (Zymo Research Corp.), siguiendo el protocolo de la casa comercial. Finalizada la extracción, se cuantificó la concentración de RNA en cada

muestra y de la calidad de estas (Abs260/Abs230 y Abs260/Abs280) usando el espectrofotómetro Nanodrop NS-1000 (Thermo Scientific). Los datos de la concentración de RNA y su calidad en cada muestra se recogen en la Tabla S1.

4.3. Síntesis de DNA complementario

Para la síntesis del DNA complementario (cDNA), a partir del RNA extraído, se realizó una retrotranscripción de RNA (RT-PCR). Se tomó el volumen correspondiente para partir de 500 ng de RNA de cada muestra. Además, algunas muestras se retrotranscribieron por duplicado para usarlas en la optimización de los primers. Para la RT-PCR se empleó el kit qScript™ cDNA SuperMix (Quanta BioScience, Inc.) siguiendo el protocolo de la casa comercial. Se usó el termociclador 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) con un programa que se basa en una fase inicial de 5 minutos a 25 °C, luego una de 30 minutos a 42 °C y una última de 5 minutos a 85 °C. El cDNA se almacenó a -20 °C hasta su uso.

4.4. Optimización de primers

Se evaluó la eficiencia de los primers de cara a realizar la PCR cuantitativa (qPCR). Para ello se hicieron diluciones seriadas de las muestras de cDNA que estaban por duplicado para usarlas como molde para la qPCR. Con los resultados del Ct (ciclo umbral) de la amplificación de estas muestras se calculó la eficiencia para cada pareja de primers (102). Los datos de los primers y su eficiencia se recogen en la Tabla 1 y las gráficas para la evaluación de la eficiencia en la Figura S1.

4.5. PCR cuantitativa (qPCR)

En el cDNA se estudió la expresión de los genes recogidos en la Tabla X mediante qPCR, técnica para la cuantificación del cDNA del gen de interés en una muestra. Para la cuantificación del DNA se usó el colorante SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific™), que se une específicamente a los ácidos nucleicos de cadena doble y emite una señal de fluorescencia cuando se expone a la luz en una longitud de onda específica, dando una señal directamente proporcional a la cantidad de DNA amplificado. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 10 µL, compuesto por 5 µL de SYBR Green qPCR Master Mix, 0,2 µL del cebador directo,

0,2 µL del cebador reverso, 2,6 µL de agua y 2 µL de cDNA diluido 1:10. Las reacciones se llevaron a cabo en el aparato Step One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems Inc.). Los resultados se normalizaron con el gen *housekeeping Gapdh* y se analizaron con el método $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ (102).

Las condiciones del termociclado fueron las siguientes: una primera fase mantenida de 20 segundos a 95 °C, luego 40 ciclos de 3 segundos a 95 °C y 30 segundos a 60 °C. Los valores de Ct se normalizaron con los valores Ct del *Gapdh*, obteniendo ΔCt , y estos valores se compararon entre muestras en el análisis estadístico.

Tabla 1. Secuencias y eficiencia de los primers usados para la qPCR.

Símbolo del gen	Secuencia (5' a 3')	Eficiencia (%)
<i>Drp1</i>	(F) GCGCTGATCCCGCGTCAT	103,75
	(R) CCGCACCCACTGTGTTGA	
<i>Mfn1</i>	(F) CCAGGTACAGATGTCACCACAG	108,44
	(R) TTGGAGAGCCGCTCATTACCT	
<i>Mfn2</i>	(F) GTGGAATACGCCAGTGAGAAGC	103,16
	(R) CAACTTGCTGGCACAGATGAGC	
<i>Pdk1</i>	(F) TTA CT CAG TGG AAC ACC GCC	107,78
	(R) GTTTATCCCCCGATT CAGGT	
<i>Pdk2</i>	(F) GAAGAATGCGTCCCTGGCAG	112,19
	(R) GGTTCCGGATGGTGACCAGG	
<i>Pdk3</i>	(F) TCCTGGACTTCGGAAGGGATA	83,26
	(R) GAAGGGCGGTTCAACAAGTTA	
<i>Pdk4</i>	(F) CCCGCTGTCCATGAAGCAGC	96,23
	(R) CCAATGTGGCTTGGGTTTCC	
<i>Tmem182</i>	(F) TCAGTGGCGTTGTGGA	124,23
	(R) GGAGTCGTAGGAGGTGG	
<i>MyoD1</i>	(F) CGAGCACTACAGTTGGCGACTAAGAT	82,71
	(R) GCTCCACTATGCTGGACAGGCAGT	
<i>MyoG</i>	(F) CCATCCAGTACATTGAGCGCCTACA	85,99
	(R) ACGATGGACGTAAGGGAGTGCAGAT	
<i>Itgb1</i>	(F) TTCAGACTCCGCATTGGCT	116,97
	(R) CAGCCAATCAGCGATCCACA	
<i>Opa1</i>	(F) TCTCAGCCTTGCTGTGTCAGAC	88,79
	(R) TTCCGTCTCTAGGTTAAAGCGCG	
<i>Gapdh</i>	(F) AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	93,25
	(R) GGGGTCGTTGATGGCAACA	

Drp1: dynamin related protein 1, *Mfn*: mitofusina, *Pdk*: piruvato deshidrogenasa kinasa , *Tmem182*: proteína transmembrana 182, *MyoD*: factor de diferenciación miogénica 1, *MyoG*: miogenina 1, *Itgb1*: subunidad beta 1 de la integrina , *Opa1*: optic atrophy 1, *Gapdh*: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

4.6. Extracción y cuantificación de proteína

Se realizó la extracción de proteína del cuádriceps del modelo animal SOD1G93A y sus controles. Para ello se usó la segunda mitad de las muestras de cuádriceps, en concreto de ratones WT de 40 días (n = 4) y de 120 días (n = 4); y ratones SOD1G93A de 40 días (n = 4) y de 120 días (n = 4). Para llevar a cabo la extracción, el tejido almacenado y congelado a -80 °C, se añadió a un tubo con el tampón RIPA (radioimmunoprecipitation assay) con antiproteasas y antifosfatasas (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) para pulverizarlo en un aparato, Tissue Lyser LT (Qiagen), que permite lisar el tejido hasta quedar resuspendido en el tampón. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 10.000 g durante 10 minutos a 4 °C para obtener la fracción proteica de la muestra, que se cuantificó mediante el método del ácido bicinonínico o BCA. El método consiste en la elaboración de una recta patrón de BSA (albúmina de suero bovino) y la posterior interpolación de los valores de absorbancia obtenidos en las muestras para estimar su concentración proteica. La absorbancia se midió a 562 nm en un espectrofotómetro (Infinite F200, Tecan Ibérica Instrumentación) ya que es la longitud de onda a la que absorbe el óxido de cobre, producto de la oxidación del reactivo usado al unirse a los enlaces peptídicos y cuya concentración es proporcional a la cantidad de proteína de la muestra.

4.7. Western blot

El primer paso del Western Blot consiste en la separación de las proteínas de la muestra en función de su tamaño mediante una electroforesis. En primer lugar, las muestras se desnaturalizaron a 95 °C durante 5 minutos en tampón RIPA. Después se cargaron 25 µg de proteína de cada muestra en un gel de acrilamida al 10 % cuya composición se describe en la Tabla S2. Una vez hecha la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) Amersham Hybond P 0.45 PVDF (Ge Healthcare Life Science). Tanto para la electroforesis como para la transferencia, se usó la fuente PowerPac 300 (BioRad).

Luego, se procedió con la inmunodetección de las proteínas en la membrana, para lo cual se realizó un bloqueo de los sitios inespecíficos de la membrana con una solución de TTBS 1x con BSA al 5 %, con la membrana en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalizado

el bloqueo, se incubó la membrana en agitación con los anticuerpos primarios específicos para cada proteína durante toda la noche a la dilución adecuada para cada proteína en la solución de bloqueo descrita anteriormente. Tras unos lavados, se incubó el anticuerpo secundario unido a la enzima HRP (*horseradish peroxidase*), 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados para la detección de cada proteína están detallados en la Tabla S3. Por último, se procedió con la inmunodetección, que consiste en la adición de un sustrato quimioluminiscente a la membrana, Immobilon Crescendo Western HRP Substrate (Millipore), que reacciona con el producto de la reacción de la HRP liberando energía en forma de luz, dando una señal luminiscente que fue detectada usando el equipo Molecular Imager® VersaDoc™ MP 4000 system. Los resultados obtenidos se normalizaron con la proteína *housekeeping* gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (Promokine). El análisis se realizó mediante densitometría de las bandas obtenidas utilizando el programa informático AlphaEase FC software (Bonsai Technologies Group).

La composición de las soluciones utilizadas para el Western Blot se detalla en la Tabla S4.

4.8. Análisis estadístico

Tanto los análisis estadísticos como la elaboración de los gráficos se llevaron a cabo con los programas informáticos SPSS (Versión 20, IBM), GraphPad Prism Software (Versión 5.0) y Microsoft Excel (versión 2303). Los niveles de significación se establecieron cuando el p-valor fue menor de 0,05.

En relación a las pruebas estadísticas empleadas, para comprobar la normalidad de los datos se usó la prueba de Shapiro-wilk. Para comparar las medias de variables cuantitativas se usaron las pruebas de t-student o U de Mann-Whitney, en función de la normalidad de los datos.

5. RESULTADOS

5.1. Expresión génica de factores reguladores miogénicos (MRFs) y de la familia de las piruvato deshidrogenasas quinasas (PDK)

Se analizó tanto en ratones WT como SOD1G93A la expresión génica de genes implicados en la regulación de la diferenciación y el desarrollo muscular en el cuádriceps, uno de los principales tejidos afectados en la ELA. Se evaluaron mediante qPCR los niveles de mRNA de *Myod1*, *Myog*, *Itgb1* y *Tmem182* (Figura 4).

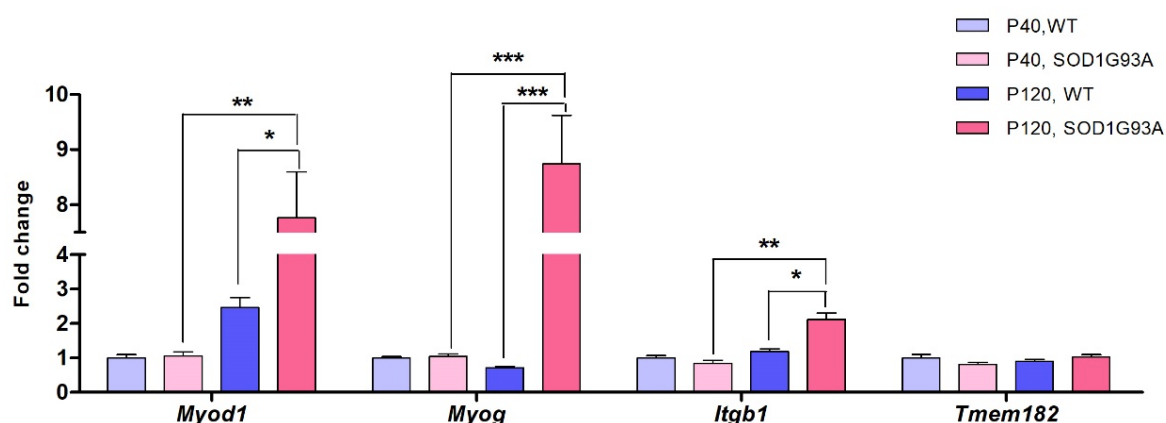


Figura 4. Expresión génica de *Myod1*, *Myog*, *Itgb1* y *Tmem182* en cuádriceps de ratones WT (n=16) y SOD1G93A (n=16) a 40 y 120 días de edad mediante qPCR. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión génica de *MyoD1*, *MyoG* e *Itgb1*. Las barras representan la media \pm la desviación estándar. ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05.

El análisis mediante qPCR mostró un aumento estadísticamente significativo en los niveles de mRNA de *Myod1*, *Myog* e *Itgb1* a los 120 días de edad en los ratones SOD1G93A con respecto a éstos a 40 días de edad y respecto a los WT de 120 días. En cambio, los niveles de *Tmem182* se mantuvieron similares en los ratones WT y SOD1G93A a todas las edades.

En estas mismas muestras se estudiaron también los genes codificantes para la familia de las PDK, relacionadas con la fosforilación oxidativa mitocondrial. En concreto, se analizó mediante qPCR los niveles de mRNA de *Pdk* en sus cuatro isoformas.

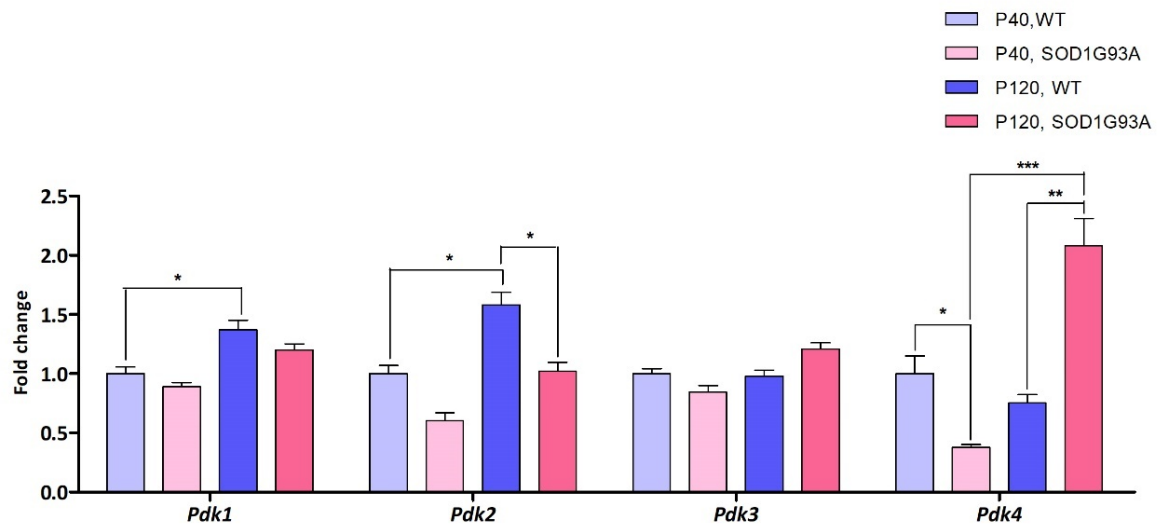


Figura 5. Expresión génica de *Pdk1*, *Pdk2*, *Pdk3* y *Pdk4* en cuádriceps de ratones WT (n=16) y SOD1G93A (n=16) a 40 y 120 días de edad mediante qPCR. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión génica de *Pdk1*, *Pdk2* y *Pdk4*. Las barras representan la media \pm la desviación estándar. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

Los resultados mostraron un aumento estadísticamente significativo en los niveles de mRNA de *Pdk1* y *Pdk2* a 120 días en los ratones WT (Figura 5). Los niveles de mRNA de *Pdk2* estaban, además, significativamente disminuidos en los ratones SOD1G93A a 120 días mientras que los niveles de *Pdk3* no cambiaron significativamente. En cuanto a *Pdk4*, los niveles de transcritos observados fueron significativamente más bajos en los ratones SOD1G93A a 40 días respecto a los WT. Por el contrario, la expresión de *Pdk4* aumentó significativamente en los ratones SOD1G93A a los 120 días, respecto a los 40 días de edad, y también respecto a los ratones WT a 120 días de edad.

5.2. Expresión génica y proteica en músculo de los factores implicados en la fusión mitocondrial en los animales SOD1G93A frente a sus controles

Se analizó mediante qPCR los niveles de expresión génica (Figura 6) y mediante Western Blot los niveles de expresión proteica (Figura 7) en el cuádriceps de ratones WT y SOD1G93A de los principales factores implicados en la fusión mitocondrial.

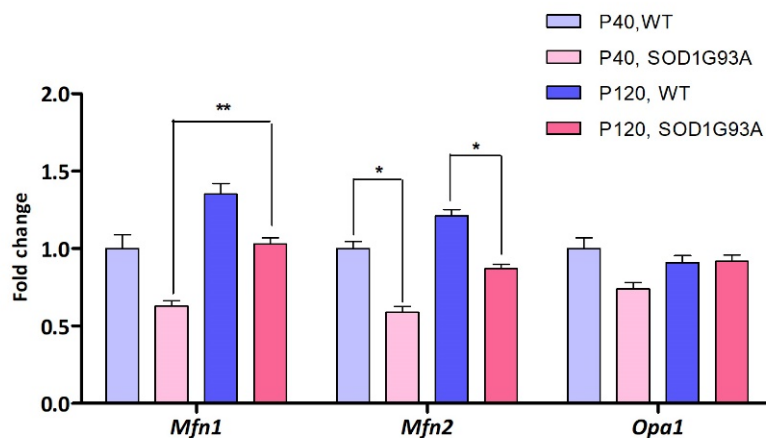


Figura 6. Expresión génica de *Mfn1*, *Mfn2* y *Opa1*, implicados en la fusión mitocondrial; en cuádriceps de ratones WT (n=16) y SOD1G93A (n=16) a 40 y 120 días de edad mediante qPCR. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión génica de *Mfn1* y *Mfn2*. Las barras representan la media \pm la desviación estándar. **p<0.01, *p<0.05.

Tras el análisis mediante qPCR, se observó que los niveles de mRNA de *Mfn1* estaban incrementados de forma estadísticamente significativa en los ratones SOD1G93A a 120 días respecto a los de 40 días de edad. Por el contrario, los niveles de *Mfn2* se encontraron decrementados en los ratones SOD1G93A respecto a los WT tanto a 40 días de edad como a los 120 días de edad. Por último, no se observó ningún cambio en los niveles de *Opa1*.

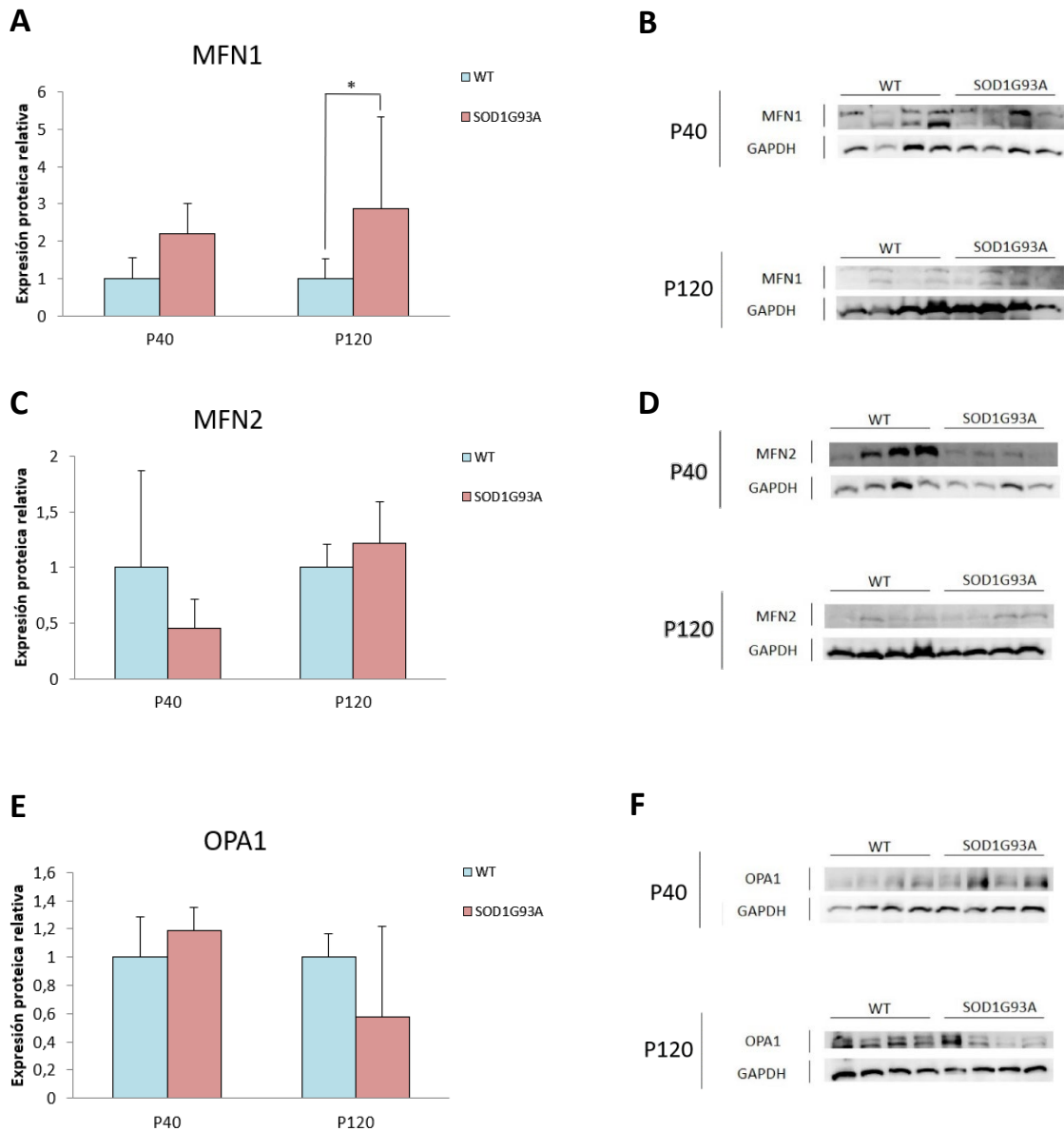


Figura 7. Expresión proteica relativa de MFN1 (A, B), MFN2 (C, D) y OPA1 (E, F), implicados en la fusión mitocondrial, en cuádriceps de ratones WT (n=8) y SOD1G93A (n=8) a 40 y 120 días de edad mediante Western Blot. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión proteica relativa de MFN1 a P120. Las barras representan la media \pm la desviación estándar. * $p < 0.05$.

El análisis mediante Western Blot mostró un aumento estadísticamente significativo de los niveles proteicos de MFN1 en el cuádriceps de ratones SOD1G93A a 120 días de edad en comparación con los niveles obtenidos en ratones WT (A, B). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre animales WT y SOD1G93A en MFN2 (C, D) ni OPA1 (E, F).

5.3. Expresión génica y proteica en músculo de los factores implicados en la fisión mitocondrial en los animales SOD1G93A frente a sus controles

Se analizó mediante qPCR los niveles de expresión génica (Figura 8) y mediante Western Blot los niveles de expresión proteica (Figura 9) en el cuádriceps de ratones WT y SOD1G93A de Drp1, la proteína más importante implicada en la fisión mitocondrial.

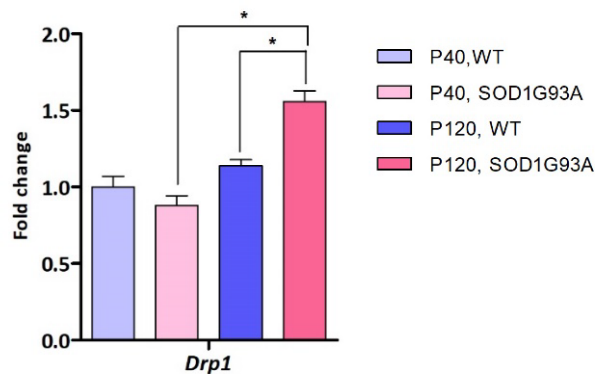


Figura 8. Expresión génica de *Drp1*, implicado en la fisión mitocondrial; en cuádriceps de ratones WT (n=16) y SOD1G93A (n=16) a 40 y 120 días de edad mediante qPCR. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión génica de *Drp1*. Las barras representan la media \pm la desviación estándar. * $p < 0.05$.

Los niveles de mRNA de *Drp1* estaban incrementados de forma estadísticamente significativa a 120 días en los ratones SOD1G93A respecto a estos mismos a 40 días y respecto a los WT a 120 días.

Los niveles de expresión proteica se analizaron en condiciones sin fosforilar (DRP1) (A, B) y en estado pro-fisión fosforilada (pDRP1) (C, D) y se observó un incremento de los niveles proteicos de DRP1 a 120 días en los ratones SOD1G93A respecto a los WT (A). De forma similar, los niveles proteicos de pDRP1 fueron significativamente más altos en los ratones SOD1G93A en comparación a los observados en los animales WT tanto a los 40 días como a los 120 días de edad (C).

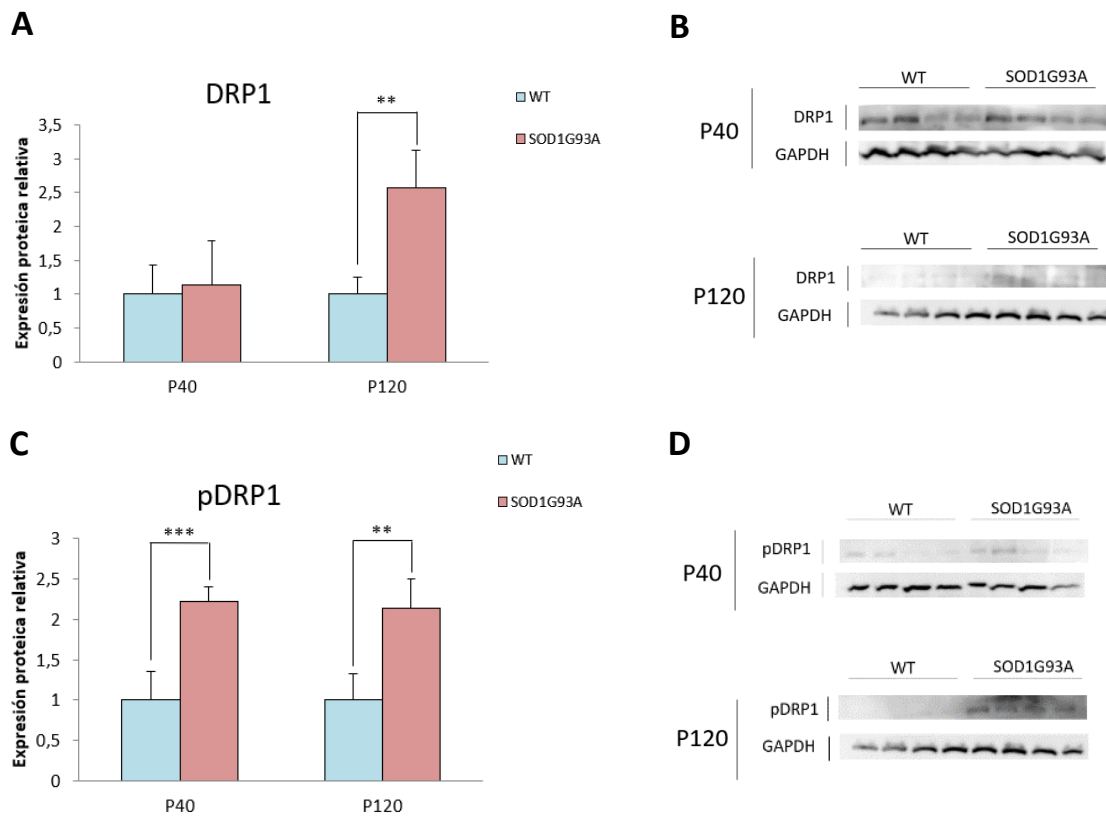


Figura 9. Expresión proteica relativa de DRP1 (A, B) y pDRP1 (C, D), implicados en la fisión mitocondrial, en cuádriceps de ratones WT (n=8) y SOD1G93A (n=8) a 40 y 120 días de edad mediante Western Blot. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión proteica relativa de DRP1 a P120 y de pDRP1 a P40 y P120. Las barras representan la media \pm la desviación estándar. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$.

5.4. Expresión proteica de factores implicados en la dinámica mitocondrial a lo largo de la enfermedad en ratones SOD1G93A

Debido al interés en estudiar la dinámica mitocondrial en el músculo durante la progresión de la enfermedad, se compararon también los niveles de expresión proteica en cuádriceps de ratones SOD1G93A en un estadio sintomático temprano de la enfermedad, 40 días de edad y en una fase terminal de la enfermedad, 120 días de edad.

5.4.1. Fisión mitocondrial

Se analizó primero la expresión de DRP1, tanto en su forma fosforilada como defosforilada, esta vez sólo en ratones SOD1G93A en los estadios presintomático y terminal de la enfermedad. El análisis mediante Western Blot no mostró cambios estadísticamente

significativos en los niveles de expresión proteica relativa de DRP1 ni de pDRP1 con la progresión de la enfermedad (Figura 10).

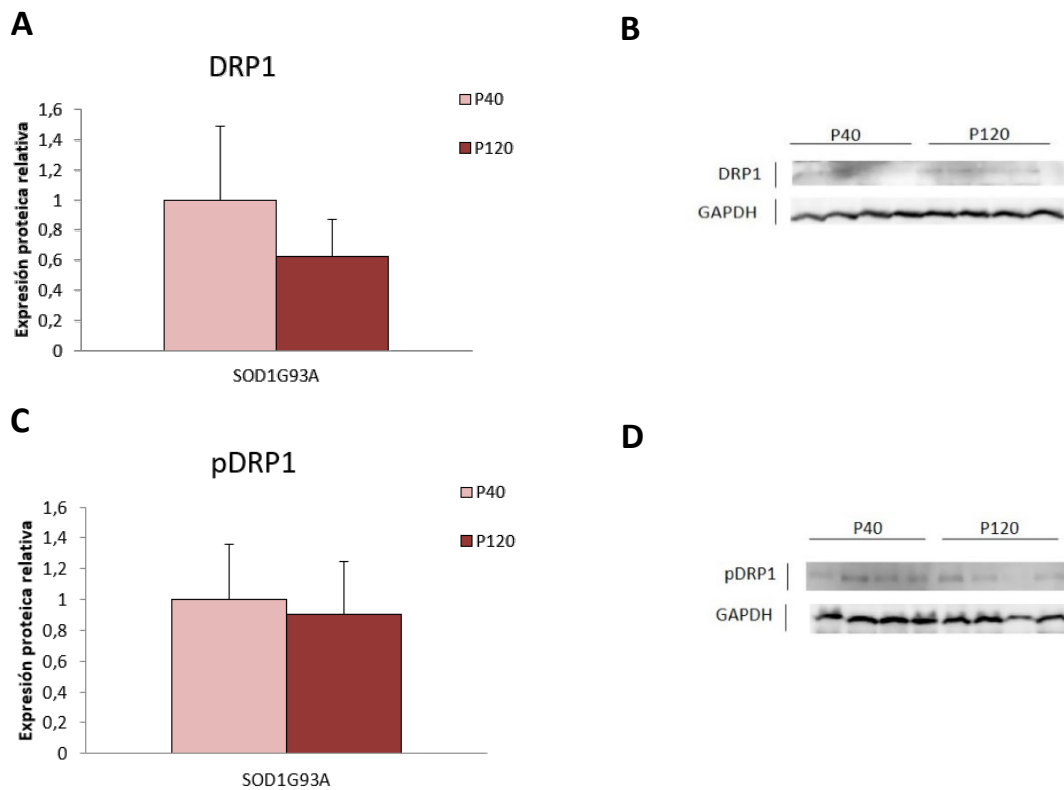


Figura 10. Expresión proteica relativa de DRP1 (A, B) y pDRP1 (C, D), implicados en la fisión mitocondrial, en cuádriceps de ratones SOD1G93A (n=8) a 40 y 120 días de edad mediante Western Blot. Las barras representan la media \pm la desviación estándar.

5.4.2. Fusión mitocondrial

Los niveles de expresión de las proteínas responsables de la fusión mitocondrial también fueron analizados a 40 y 120 días en cuádriceps de ratones SOD1G93A. Se observó un aumento estadísticamente significativo en los niveles proteicos de MFN1, mientras que los de MFN2 y OPA1 no mostraron cambios significativos (Figura 11).

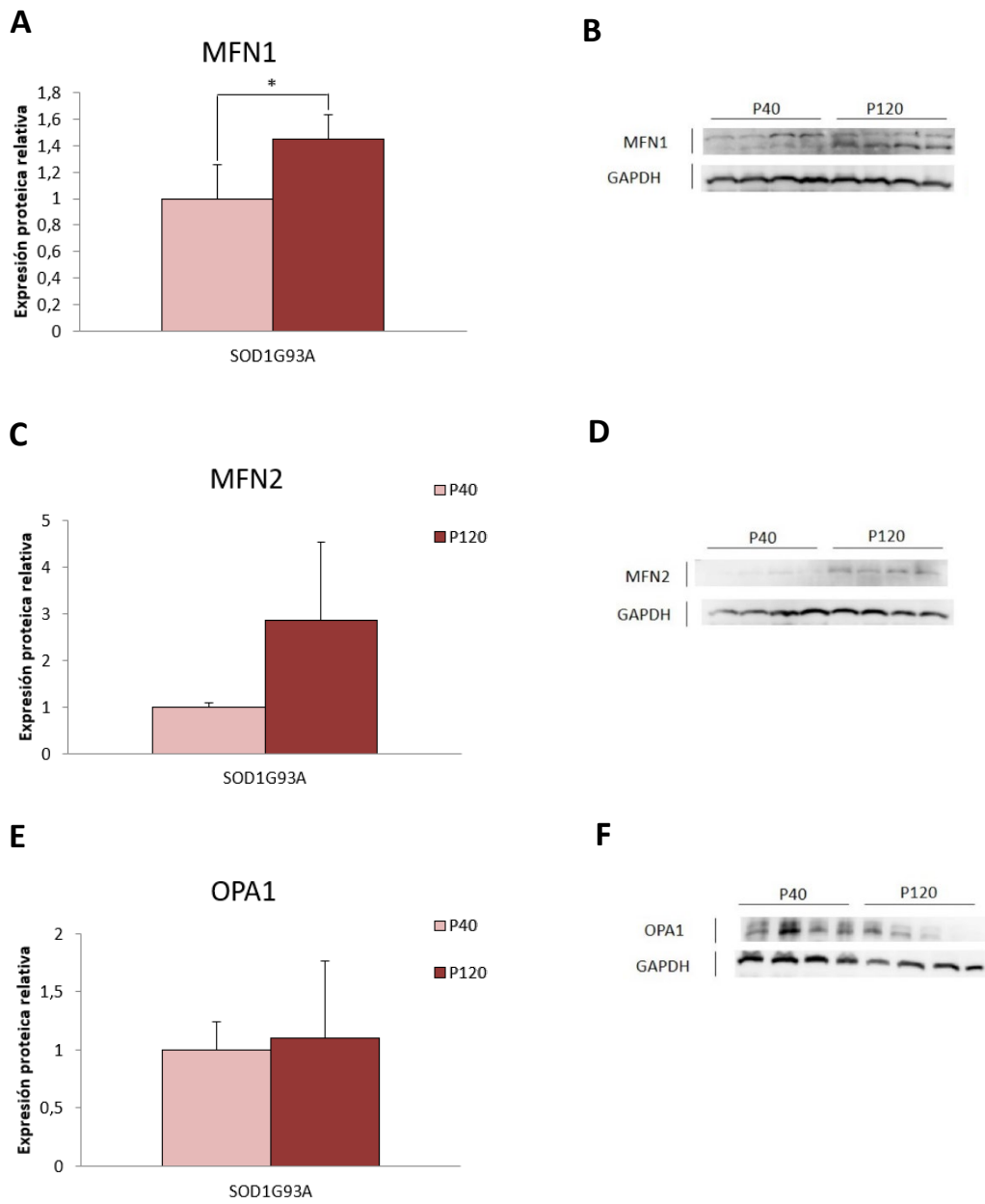


Figura 11. Expresión proteica relativa de MFN1 (A, B), MFN2 (C, D) y OPA1 (E, F), implicados en la fusión mitocondrial, en cuádriceps de ratones SOD1G93A (n=8) a 40 y 120 días de edad mediante Western Blot. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión proteica relativa de MFN1. Las barras representan la media \pm la desviación estándar. * $p < 0.05$.

6. DISCUSIÓN

La implicación del músculo esquelético en la patología de la ELA ha sido ampliamente demostrada por numerosos estudios (103, 104, 105). El primer objetivo de este trabajo consistió en verificar la existencia de una alteración en los factores de regulación miogénica en el músculo esquelético del modelo animal de ELA SOD1G93A. Esto se confirmó mediante estudios de expresión génica. En el estadio presintomático no se observaron diferencias, como era esperable. Sin embargo, se observó un aumento en la transcripción de los genes codificantes para *Myod1* y *Myog* en los animales SOD1G93A en el estadio terminal de la enfermedad con respecto a sus controles y a los animales presintomáticos. También se estudió por primera vez en este modelo animal, los niveles de expresión de *Itgb1* y los de *Tmem182*, relacionados también con la diferenciación miogénica. Se observó un incremento en los transcritos de *Itgb1* en los animales SOD1G93A en el estadio terminal, lo que sugiere una posible activación de los procesos en los que está involucrado: activación de células satélite, adhesión y migración celular (62). Sin embargo, contrariamente a lo esperado su regulador negativo *Tmem182* no sufrió modificaciones, lo que descartaría su contribución en este mecanismo. En este estadio terminal, los ratones ya presentan atrofia muscular y parálisis (106), por lo que el daño muscular es evidente; pero este aumento en los transcritos de los factores reguladores miogénicos y de regeneración muscular es un claro indicativo de un intento de respuesta regenerativa por parte del músculo frente al daño que sufre en la enfermedad. Aun así, parece que esta respuesta resulta ineficiente para mitigar la atrofia muscular progresiva que se observa con el avance de la enfermedad (63).

Como se mencionó anteriormente, la mitocondria desempeña un papel crucial en el músculo y en la patología de la ELA. Con el objetivo de detectar posibles alteraciones en la regulación de la función mitocondrial en el músculo esquelético en el modelo animal utilizado, se evaluaron los niveles de transcripción de los genes que codifican las diferentes isoformas de la piruvato deshidrogenasa quinasa (PDK). La PDH es responsable de convertir el piruvato, producto final de la glucólisis, en acetil-CoA para su entrada al ciclo de Krebs y la producción de ATP y combustible energético a través de la fosforilación oxidativa. Como se explicó en la introducción, la PDK actúa como un regulador negativo del complejo PDH, y sus niveles pueden indicar un funcionamiento normal o alterado de las mitocondrias en las células, ya

que desempeña un papel crucial en el equilibrio entre el flujo de glucosa y ácidos grasos hacia la mitocondria para la generación de energía (108).

Los estudios de expresión génica mostraron un incremento muy significativo en los niveles de transcripción de *Pdk4* en el músculo de los ratones SOD1G93A a los 120 días, que codifica para la isoforma principal de la proteína PDK en el músculo (107). Este incremento podría inhibir la síntesis de acetil-CoA a partir del piruvato en el músculo de estos ratones. Ya se ha descrito este comportamiento en otro modelo de ELA similar, el cual provoca una disminución de la producción de energía y desvía la obtención de ésta mediante la oxidación de ácidos grasos, lo que contribuye al incremento de los niveles de ROS y agravan la disfunción mitocondrial (108). Estas observaciones son consistentes con los cambios que se han observado de metabolismo glucolítico a oxidativo en las fibras musculares en pacientes de ELA (109), en el modelo SOD1G93A (110) y en ratones que expresan la SOD1 mutante específicamente en músculo (111); siendo la PDK4 una de las principales proteínas implicadas en este cambio y desequilibrio metabólico a nivel del músculo.

Como se ha mencionado en la introducción, la dinámica mitocondrial juega un papel clave en el mantenimiento de la funcionalidad de la red mitocondrial celular. Esto es especialmente importante para las células del músculo esquelético, ya que asegura un funcionamiento óptimo, especialmente en situaciones de respuesta al daño muscular.

Una vez verificada la existencia de una alteración en los factores de regulación miogénica y de la regulación de la función mitocondrial en el músculo esquelético del modelo animal SOD1G93A, se abordó el estudio de las principales moléculas responsables de la dinámica mitocondrial. A nivel transcripcional la fusión mitocondrial en el modelo SOD1G93A se encontró regulada negativamente respecto a los ratones WT, ya que la expresión de *Mfn2* estaba disminuida en estos ratones ya desde los primeros estadios presintomáticos de la enfermedad. De forma similar, *Mfn1* también mostró niveles de mRNA disminuidos en los ratones SOD1G93A con respecto a los WT, pese a incrementar con la edad y el avance de la enfermedad. A nivel proteico, estas moléculas responsables de la fusión mitocondrial mostraron menos cambios que a nivel transcriptómico, ya que sólo fue significativo el aumento de los niveles de MFN1 en los ratones en el estadio terminal de la enfermedad respecto a los sanos. *A priori*, estos resultados no concuerdan con los niveles disminuidos de mRNA que se habían encontrado de *Mfn1*, pero podría explicarse con una rápida traducción

de los transcritos, lo cual llevaría a unos bajos niveles de mRNA y altos de proteína, como ocurre con otras proteínas (63). Con el avance de la enfermedad se observó una clara tendencia de aumento en la expresión de las proteínas de la fusión de la membrana externa mitocondrial, comportamiento que también se observó en los niveles de mRNA.

En cuanto a los factores implicados en la fisión mitocondrial, a nivel transcripcional no se observaron diferencias en estadios presintomáticos. Sin embargo, se observó una regulación positiva del proceso de fisión mitocondrial en el modelo SOD1G93A en la fase terminal de la enfermedad mediante el incremento de Drp1, cuando en ratones WT apenas incrementó con la edad. A nivel proteico, la tendencia observada en los ratones SOD1G93A fue similar a la obtenida a nivel génico: una regulación positiva de DRP1 con el avance de la enfermedad respecto a ratones sanos, lo que resultaría en una fisión incrementada. Se detectó también, desde estadios presintomáticos de la enfermedad, un aumento de la forma fosforilada de la DRP1, la cual es más propensa a la fisión, lo que evidenciaría la hiperactivación de la fisión mitocondrial que existe en el modelo SOD1G93A, en este caso desde fases tempranas de la enfermedad. Con la progresión de la enfermedad, la expresión de DRP1 disminuyó levemente en los ratones SOD1G93A, pese a mostrar niveles de expresión mucho más altos que los ratones WT a los 120 días de edad. Esto sugiere que con el paso del tiempo los niveles de la proteína van bajando en ratones sanos, pero se mantienen elevados en la enfermedad.

En base a estas observaciones formulamos la hipótesis de que la dinámica mitocondrial en el músculo esquelético del modelo SOD1G93A se encuentra alterada. Está alteración comienza de manera leve en el estadio presintomático, en concordancia con las observaciones morfológicas que se han visto previamente en este tejido en el modelo antes de la retracción axonal (99). Sin embargo, no es hasta una fase más avanzada de la enfermedad cuando se observan cambios a nivel molecular y se evidencia una alteración significativa en los niveles de las moléculas involucradas tanto en los procesos de fusión como, principalmente, en los de fisión mitocondrial. En este último caso, se observa una excesiva regulación positiva.

Se ha comprobado que la enzima SOD1, a pesar de ser una enzima citosólica, se acumula en diferentes orgánulos intracelulares como la mitocondria (114, 115), comportamiento que también se ha observado en músculo esquelético (99). Cuando la proteína se encuentra con la mutación de glicina a alanina en el codón 93, esta se acumula en forma de agregados en la mitocondria, lo cual afecta a su funcionamiento. Además, al expresar específicamente

SOD1G93A en músculo esquelético de ratones WT, se ha confirmado que la dinámica mitocondrial, a efectos morfológicos, se ve afectada de la misma manera, descartando que estas alteraciones se deban a la degeneración de la neurona motora y confirmando que son resultado de la expresión de la proteína SOD1 mutada en el músculo (99).

Si bien puede afectar a personas de cualquier edad, la incidencia de la ELA tiende a aumentar con el envejecimiento. Además, la enfermedad progresa y empeora con el tiempo. Se cree que la SOD1 mutante puede causar toxicidad mitocondrial de forma progresiva (115). Es decir, la expresión a corto plazo de la SOD1 mutada en el citosol puede no ser suficiente para causar defectos morfológicos y funcionales en las mitocondrias del músculo esquelético (99), pero con el tiempo, la acumulación de esta proteína en la mitocondria puede conducir a las alteraciones observadas a los 120 días de edad en el modelo.

Además de una alteración en la morfología mitocondrial, se ha visto una producción aumentada de ROS mitocondriales (116) y una despolarización de la membrana mitocondrial interna en el músculo esquelético de los ratones SOD1G93A (99), a lo que hay que añadir el desequilibrio en el metabolismo mitocondrial que hemos descrito en este trabajo. Estos fallos en la función mitocondrial son compensados por la célula a través del mecanismo de mitofagia, proceso mediante el cual las células eliminan las mitocondrias disfuncionales a través de su autofagocitosis (117). La mitofagia se facilita si el volumen de las mitocondrias es menor, y es aquí donde entra en juego el mecanismo de fisión mitocondrial. Este proceso puede favorecer la mitofagia al fragmentar las mitocondrias en unidades más pequeñas, lo que las hace más susceptibles de ser eliminadas por este mecanismo de degradación de mitocondrias disfuncionales (118). Por tanto, se puede plantear la hipótesis de que en los ratones SOD1G93A en los cuales existe una función mitocondrial alterada, el equilibrio fisión-fusión se desplaza hacia la fisión, aumentando la expresión de las proteínas involucradas en el proceso para conseguir un menor tamaño de las mitocondrias, para que el mecanismo de autofagia degrade estas mitocondrias que se encuentran dañadas (Figura 12).

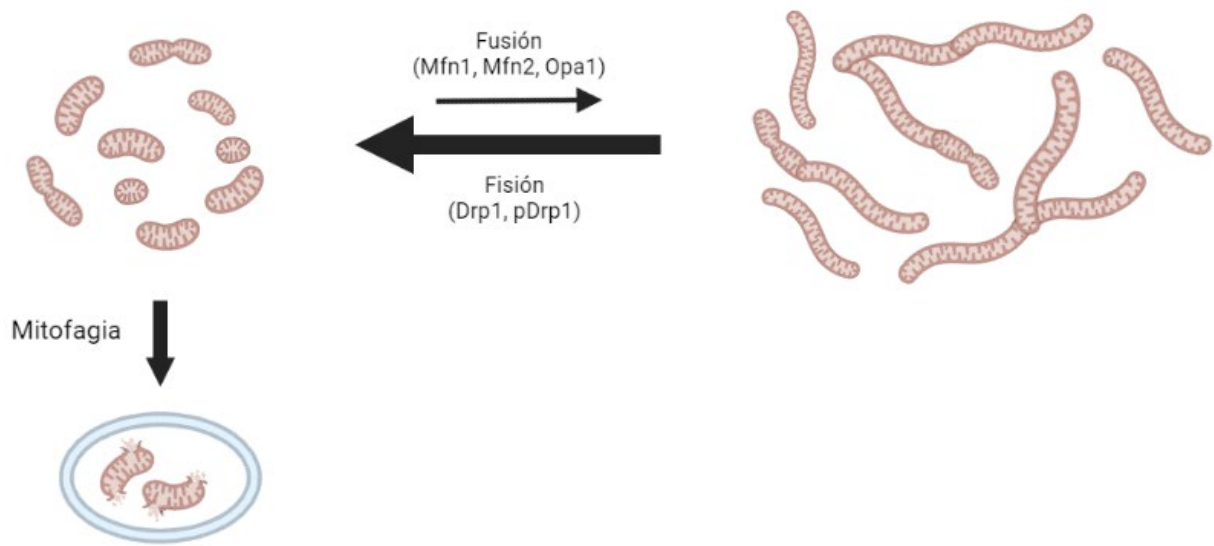


Figura 12. Equilibrio fisión/fusión mitocondrial. Hecho con BioRender.

Unos niveles de fisión mitocondrial fisiológicos son necesarios para mantener la calidad mitocondrial de la célula, pero una fisión excesiva resulta perjudicial, al causar fragmentación mitocondrial, despolarización de la membrana mitocondrial, incremento en la producción de ROS y estrés oxidativo, así como una menor producción de ATP y otras funciones mitocondriales (119, 120, 121), por lo que es posible que todos estos procesos estén teniendo lugar en el músculo esquelético del modelo SOD1G93A.

Además de los cambios en la fisión mitocondrial, también hemos observado alteraciones en la fusión mitocondrial en el músculo esquelético del modelo de ELA. El aumento en la expresión de las proteínas Mfn1 y Mfn2 podría ser un intento de compensar la excesiva fisión mitocondrial, aunque resulta insuficiente para restaurar el equilibrio.

En relación con la regeneración muscular, la dinámica mitocondrial, y en particular la fisión mitocondrial, son necesarias para la expansión eficiente de las células satélite durante la misma al regular, entre otros, el metabolismo mitocondrial y la proteostasis (88). Nuestros resultados muestran a nivel transcriptómico una activación génica de los MRFs estudiados y una situación de hiperactivación de la fisión mitocondrial, lo que *a priori* debería de favorecer la proliferación y diferenciación de las células satélite musculares. Sin embargo, se ha demostrado que la capacidad proliferativa de las células satélite musculares está alterada en

ELA (64), así como su morfología y capacidad de diferenciación (122, 123). Por lo tanto, nuestros resultados indicarían que los defectos en la dinámica mitocondrial no son la causa principal de la disfunción en la regeneración muscular de las células satélite y pueden existir otras alteraciones en los mecanismos de activación específicos de estas células satélite.

Actualmente no existe una cura para la ELA y los tratamientos se centran en el manejo de los síntomas y en mejorar la calidad de vida de los pacientes. Sin embargo, debido a la naturaleza de la enfermedad, existe una clara necesidad de desarrollar nuevas terapias que puedan ralentizar su progresión o incluso detenerla. En este trabajo hemos observado una excesiva fisión mitocondrial en el músculo esquelético con un posible efecto patológico en la ELA, por lo que este mecanismo y sus moléculas implicadas se está planteando como diana terapéutica para dicha enfermedad. Se han realizado estudios preclínicos en ratones SOD1G93A que han demostrado que la administración de Mdivi-1, un inhibidor de Drp1 presentan una reversión en la fragmentación mitocondrial en las fibras musculares. Sin embargo, esta molécula actúa bloqueando toda la maquinaria de fisión, ya que la selectividad de Mdivi-1 hacia Drp1 ha sido cuestionada (124). Como hemos comentado anteriormente la fisión mitocondrial, fisiológica, juega un papel clave en la proliferación y diferenciación celular, así como para el mantenimiento de la calidad mitocondrial; por lo que su inhibición resulta perjudicial. Sería más beneficioso desarrollar un inhibidor de la fisión mitocondrial que actúe específicamente sobre el exceso de fisión presente en la ELA, sin afectar los niveles fisiológicos.

También se ha investigado otro inhibidor de la fisión mitocondrial, P110, un péptido de 7 aminoácidos que tiene homología de secuencia entre Drp1 y Fis1, ejerciendo un efecto de inhibición sobre su interacción. En un primer momento se demostró que presenta un efecto beneficioso contra la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Huntington (125). Este inhibidor no afecta a la interacción de Drp1 con otros adaptadores e inhibe selectivamente la fisión y fragmentación mitocondrial fisiológica, no la patológica (126). La molécula redujo la fragmentación mitocondrial tanto en fibroblastos derivados de pacientes de ELA como en cultivos de motoneuronas expresando SOD1G93A. Posteriormente se evaluó su eficacia en el modelo animal SOD1G93A. Los resultados mostraron que la inhibición *in vivo* de la interacción Drp1-Fis1 administrando P110 en un estadio sintomático de la enfermedad era segura y reducía los fallos musculares y motores de la enfermedad e incrementaba la supervivencia del modelo animal (97). Los autores proponen un ciclo vicioso desencadenado por la agregación

proteica que existe con las mutaciones asociadas a la ELA (Figura 13), en el cual la producción de ATP disminuye y aumenta la de ROS, favoreciendo la apoptosis y desencadenando una fisión mitocondrial excesiva. Así pues, se reduce todavía más la función mitocondrial limitando procesos como la autofagia y el control de calidad de proteínas, lo que aumenta la agregación de proteínas anómalas. P110 inhibiría la fragmentación mitocondrial y contribuiría a la ruptura de este ciclo vicioso, mejorando la función mitocondrial.

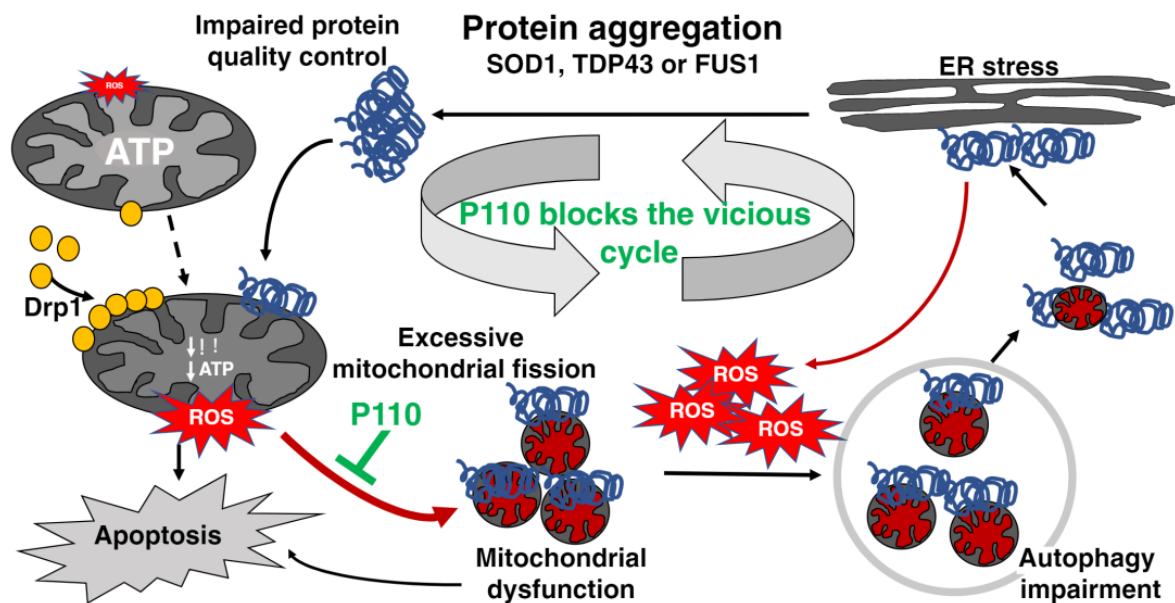


Figura 13. Ciclo vicioso desencadenado por la agregación proteica en ELA y dónde interviene P110 (97).

Así, la dinámica mitocondrial y en especial el proceso de fisión mitocondrial en el músculo podría ser una prometedora diana terapéutica. Actuando sobre ella se podría mejorar la integridad de la masa mitocondrial, incrementar los niveles de ATP, mejorar la reparación celular y los mecanismos de control de calidad, así como disminuir los niveles de ROS mitocondriales, reduciendo el estrés oxidativo, pudiendo suponer una mejora en la respuesta del músculo a la enfermedad.

Por último, la identificación de biomarcadores para la ELA es de suma importancia ya que pueden ayudar en el diagnóstico temprano, la monitorización de la progresión de la enfermedad, y la evaluación de la eficacia de tratamientos. Las moléculas relacionadas con la

dinámica mitocondrial podrían considerarse potenciales biomarcadores incluso si estos no se dirigen específicamente a la dinámica mitocondrial. A este respecto son necesarios más estudios para valorar su validez en un primer momento en modelos animales para posteriormente poder ser estudiados en pacientes.

Si bien los resultados obtenidos hasta ahora revelan la importancia de la dinámica mitocondrial en el músculo esquelético en el contexto de la ELA, se requiere una mayor investigación para obtener una comprensión más completa de sus implicaciones y mecanismos subyacentes.

7. CONCLUSIONES

Basándonos en los resultados obtenidos mediante este estudio y su discusión y contraste con otras contribuciones, podemos extraer las siguientes conclusiones:

1. En el músculo esquelético del modelo animal SOD1G93A de ELA, se observa una regulación positiva a nivel transcripcional de los factores reguladores miogénicos y de la piruvato deshidrogenasa quinasa. Esto demuestra la existencia de procesos de regeneración muscular y alteraciones mitocondriales en el músculo esquelético en la ELA.
2. Los mecanismos de fisión y de fusión involucrados en la dinámica mitocondrial están desregulados en el músculo esquelético del modelo SOD1G93A.
3. El proceso de fisión mitocondrial en el músculo esquelético del modelo animal SOD1G93A se encuentra hiperactivado. Esto resulta en una excesiva fragmentación de la red mitocondrial y está relacionado con una situación de disfunción mitocondrial que contribuye a la patogenia de la enfermedad.
4. Los mecanismos implicados en la dinámica mitocondrial, preferentemente el de fisión mitocondrial, constituyen una prometedora diana terapéutica para la ELA.

CONCLUSIONS

Based on the results obtained in this study and their discussion and comparison with other contributions, the following conclusions can be drawn:

1. In the skeletal muscle of the SOD1G93A animal model of ALS, a positive transcriptional regulation of myogenic regulatory factors and pyruvate dehydrogenase kinase is observed. This demonstrates the existence of muscle regeneration processes and mitochondrial alterations in skeletal muscle in ALS.
2. Fission and fusion mechanisms involved in mitochondrial dynamics are dysregulated in skeletal muscle of the SOD1G93A model.
3. The mitochondrial fission process in the skeletal muscle of the SOD1G93A animal model is hyperactivated. This results in excessive fragmentation of the mitochondrial network and is

related to a situation of mitochondrial dysfunction that contributes to the pathogenesis of the disease.

4. The mechanisms involved in mitochondrial dynamics, preferably mitochondrial fission, constitute a promising therapeutic target for ALS.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Mora Pardina, J.S. Esclerosis Lateral Amiotrófica y otras Enfermedades de la Motoneurona. Tratado de Neurología Clínica. Ars Médica. 2008;797-826.
2. Marin B, Boumédiene F, Logroschino G, Couratier P, Babron MC, Leutenegger AL, et al. Variation in worldwide incidence of amyotrophic lateral sclerosis: a meta-analysis. *International Journal of Epidemiology*. 1 de febrero de 2017;46(1):57-74.
3. Logroschino G, Piccininni M. Amyotrophic Lateral Sclerosis Descriptive Epidemiology: The Origin of Geographic Difference. *NED*. 2019;52(1-2):93-103.
4. Turner MR, Al-Chalabi A, Chio A, Hardiman O, Kiernan MC, Rohrer JD, et al. Genetic screening in sporadic ALS and FTD. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1 de diciembre de 2017;88(12):1042-4.
5. Expanded GGGGCC Hexanucleotide Repeat in Noncoding Region of C9ORF72 Causes Chromosome 9p-Linked FTD and ALS - ScienceDirect [Internet]. [citado 10 de abril de 2023]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896627311008282>
6. Volk AE, Weishaupt JH, Andersen PM, Ludolph AC, Kubisch C. Current knowledge and recent insights into the genetic basis of amyotrophic lateral sclerosis. *Medizinische Genetik*. 13 de julio de 2018;30(2):252-8.
7. Reaume AG, Elliott JL, Hoffman EK, Kowall NW, Ferrante RJ, Siwek DR, et al. Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat Genet*. mayo de 1996;13(1):43-7.
8. Robberecht W, Philips T. The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurosci*. abril de 2013;14(4):248-64.
9. Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, et al. Motor Neuron Degeneration in Mice that Express a Human Cu,Zn Superoxide Dismutase Mutation. *Science*. 17 de junio de 1994;264(5166):1772-5.
10. Alexander GM, Erwin KL, Byers N, Deitch JS, Augelli BJ, Blankenhorn EP, et al. Effect of transgene copy number on survival in the G93A SOD1 transgenic mouse model of ALS. *Molecular Brain Research*. 4 de noviembre de 2004;130(1):7-15.
11. Mancuso R, Oliván S, Mancera P, Pastén-Zamorano A, Manzano R, Casas C, et al. Effect of genetic background on onset and disease progression in the SOD1-G93A model of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*. 1 de mayo de 2012;13(3):302-10.
12. Oliván S, Calvo AC, Rando A, Muñoz MJ, Zaragoza P, Osta R. Comparative study of behavioural tests in the SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Anim*. 2015;64(2):147-53.
13. Pfohl SR, Halicek MT, Mitchell CS. Characterization of the Contribution of Genetic Background and Gender to Disease Progression in the SOD1 G93A Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Meta-Analysis. *J Neuromuscul Dis*. 2015;2(2):137-50.
14. de la Torre Sebastián M, Toivonen JM, Osta Pinzolas R. Mecanismo de acción del fármaco 5-Fluorouracilo y su efectividad como tratamiento en un modelo murino de Esclerosis Lateral

- Amiotrónica. [Zaragoza]: Universidad de Zaragoza, Prensas de la Universidad; 2021. (Tesis de la Universidad de Zaragoza).
15. Vijayakumar UG, Milla V, Cynthia Stafford MY, Bjourson AJ, Duddy W, Duguez SMR. A Systematic Review of Suggested Molecular Strata, Biomarkers and Their Tissue Sources in ALS. *Frontiers in Neurology* [Internet]. 2019 [citado 10 de abril de 2023];10. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fneur.2019.00400>
 16. Nowicka N, Juranek J, Juranek JK, Wojtkiewicz J. Risk Factors and Emerging Therapies in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*. enero de 2019;20(11):2616.
 17. Full article: Risk factors for amyotrophic lateral sclerosis [Internet]. [citado 10 de abril de 2023]. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.2147/CLEP.S37505>
 18. Zufiría M, Gil-Bea FJ, Fernández-Torrón R, Poza JJ, Muñoz-Blanco JL, Rojas-García R, et al. ALS: A bucket of genes, environment, metabolism and unknown ingredients. *Progress in Neurobiology*. 1 de julio de 2016;142:104-29.
 19. Eisen A, Weber M. The motor cortex and amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle & Nerve*. 2001;24(4):564-73.
 20. Kiernan MC, Vucic S, Cheah BC, Turner MR, Eisen A, Hardiman O, et al. Amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet*. 12 de marzo de 2011;377(9769):942-55.
 21. Fischer LR, Culver DG, Tennant P, Davis AA, Wang M, Castellano-Sanchez A, et al. Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Experimental Neurology*. 1 de febrero de 2004;185(2):232-40.
 22. Dynamic neuromuscular remodeling precedes motor-unit loss in a mouse model of ALS | *eLife* [Internet]. [citado 17 de abril de 2023]. Disponible en: <https://elifesciences.org/articles/41973>
 23. Turner MR, Hardiman O, Benatar M, Brooks BR, Chio A, de Carvalho M, et al. Controversies and priorities in amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet Neurology*. 1 de marzo de 2013;12(3):310-22.
 24. Riancho J, Gonzalo I, Ruiz-Soto M, Berciano J. ¿Por qué degeneran las motoneuronas? Actualización en la patogenia de la esclerosis lateral amiotrónica. *Neurología*. 1 de enero de 2019;34(1):27-37.
 25. Laslo P, Lipski J, Nicholson LFB, Miles GB, Funk GD. GluR2 AMPA Receptor Subunit Expression in Motoneurons at Low and High Risk for Degeneration in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Experimental Neurology*. 1 de junio de 2001;169(2):461-71.
 26. Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*. marzo de 1993;362(6415):59-62.
 27. Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, Hu X, Vance C, Rogelj B, et al. TDP-43 Mutations in Familial and Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Science*. 21 de marzo de 2008;319(5870):1668-72.

28. Mutations in the FUS/TLS Gene on Chromosome 16 Cause Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis | Science [Internet]. [citado 1 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1166066>
29. De Vos KJ, Chapman AL, Tennant ME, Manser C, Tudor EL, Lau KF, et al. Familial amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutants perturb fast axonal transport to reduce axonal mitochondria content. *Human Molecular Genetics*. 15 de noviembre de 2007;16(22):2720-8.
30. Hardiman O, Al-Chalabi A, Chio A, Corr EM, Logroscino G, Robberecht W, et al. Amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Dis Primers*. 5 de octubre de 2017;3:17071.
31. Cozzolino M, Carrì MT. Mitochondrial dysfunction in ALS. *Progress in Neurobiology*. 1 de mayo de 2012;97(2):54-66.
32. Doherty GJ, McMahon HT. Mechanisms of Endocytosis. *Annual Review of Biochemistry*. 2009;78(1):857-902.
33. TDP-43 loss of function inhibits endosomal trafficking and alters trophic signaling in neurons | The EMBO Journal [Internet]. [citado 1 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://www.embopress.org/doi/full/10.15252/embj.201694221>
34. Farg MA, Sundaramoorthy V, Sultana JM, Yang S, Atkinson RAK, Levina V, et al. C9ORF72, implicated in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia, regulates endosomal trafficking. *Hum Mol Genet*. 15 de octubre de 2017;26(20):4093-4.
35. Butti Z, Patten SA. RNA Dysregulation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Frontiers in Genetics* [Internet]. 2019 [citado 1 de mayo de 2023];9. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2018.00712>
36. Dysregulated molecular pathways in amyotrophic lateral sclerosis–frontotemporal dementia spectrum disorder | The EMBO Journal [Internet]. [citado 1 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://www.embopress.org/doi/full/10.15252/embj.201797568>
37. Oxidative stress biomarkers in sporadic ALS: Amyotrophic Lateral Sclerosis: Vol 9, No 3 [Internet]. [citado 1 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/17482960801933942?journalCode=iafd19>
38. Beers DR, Appel SH. Immune dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis: mechanisms and emerging therapies. *The Lancet Neurology*. 1 de febrero de 2019;18(2):211-20.
39. Hooten KG, Beers DR, Zhao W, Appel SH. Protective and Toxic Neuroinflammation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotherapeutics*. 1 de abril de 2015;12(2):364-75.
40. Mead RJ, Shan N, Reiser HJ, Marshall F, Shaw PJ. Amyotrophic lateral sclerosis: a neurodegenerative disorder poised for successful therapeutic translation. *Nat Rev Drug Discov*. marzo de 2023;22(3):185-212.
41. Al-Chalabi A, Hardiman O, Kiernan MC, Chiò A, Rix-Brooks B, van den Berg LH. Amyotrophic lateral sclerosis: moving towards a new classification system. *Lancet Neurol*. octubre de 2016;15(11):1182-94.

42. Vucic S, Ferguson TA, Cummings C, Hotchkiss MT, Genge A, Glanzman R, et al. Gold Coast diagnostic criteria: Implications for ALS diagnosis and clinical trial enrollment. *Muscle Nerve*. noviembre de 2021;64(5):532-7.
43. Shefner JM, Al-Chalabi A, Baker MR, Cui LY, de Carvalho M, Eisen A, et al. A proposal for new diagnostic criteria for ALS. *Clin Neurophysiol*. agosto de 2020;131(8):1975-8.
44. Goutman SA, Hardiman O, Al-Chalabi A, Chió A, Savelieff MG, Kiernan MC, et al. Recent advances in the diagnosis and prognosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol*. mayo de 2022;21(5):480-93.
45. Cedarbaum JM, Stambler N, Malta E, Fuller C, Hilt D, Thurmond B, et al. The ALSFRS-R: a revised ALS functional rating scale that incorporates assessments of respiratory function. *Journal of the Neurological Sciences*. 31 de octubre de 1999;169(1):13-21.
46. Westeneng HJ, Debray TPA, Visser AE, van Eijk RPA, Rooney JPK, Calvo A, et al. Prognosis for patients with amyotrophic lateral sclerosis: development and validation of a personalised prediction model. *Lancet Neurol*. mayo de 2018;17(5):423-33.
47. Jaiswal MK. Riluzole and edaravone: A tale of two amyotrophic lateral sclerosis drugs. *Medicinal Research Reviews*. 2019;39(2):733-48.
48. Miller TM, Cudkovic ME, Genge A, Shaw PJ, Sobue G, Bucelli RC, et al. Trial of Antisense Oligonucleotide Tofersen for SOD1 ALS. *N Engl J Med*. 22 de septiembre de 2022;387(12):1099-110.
49. Paganoni S, Macklin EA, Hendrix S, Berry JD, Elliott MA, Maiser S, et al. Trial of Sodium Phenylbutyrate-Taurursodiol for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N Engl J Med*. 3 de septiembre de 2020;383(10):919-30.
50. Kiernan MC, Vucic S, Cheah BC, Turner MR, Eisen A, Hardiman O, et al. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet*. 12 de marzo de 2011;377(9769):942-55.
51. Martineau É, Di Polo A, Vande Velde C, Robitaille R. Dynamic neuromuscular remodeling precedes motor-unit loss in a mouse model of ALS. *Cleveland DW, Westbrook GL, editores. eLife*. 15 de octubre de 2018;7:e41973.
52. Fischer LR, Culver DG, Tennant P, Davis AA, Wang M, Castellano-Sanchez A, et al. Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Experimental Neurology*. 1 de febrero de 2004;185(2):232-40.
53. Hegedus J, Putman CT, Gordon T. Time course of preferential motor unit loss in the SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Disease*. 1 de noviembre de 2007;28(2):154-64.
54. Acevedo-Arozena A, Kalmar B, Essa S, Ricketts T, Joyce P, Kent R, et al. A comprehensive assessment of the SOD1G93A low-copy transgenic mouse, which models human amyotrophic lateral sclerosis. *Disease Models & Mechanisms*. 1 de septiembre de 2011;4(5):686-700.
55. Lino MM, Schneider C, Caroni P. Accumulation of SOD1 mutants in postnatal motoneurons does not cause motoneuron pathology or motoneuron disease. *J Neurosci*. 15 de junio de 2002;22(12):4825-32.

-
56. Pramatarova A, Laganière J, Roussel J, Brisebois K, Rouleau GA. Neuron-Specific Expression of Mutant Superoxide Dismutase 1 in Transgenic Mice Does Not Lead to Motor Impairment. *J Neurosci*. 15 de mayo de 2001;21(10):3369-74.
 57. Boillée S, Yamanaka K, Lobsiger CS, Copeland NG, Jenkins NA, Kassiotis G, et al. Onset and Progression in Inherited ALS Determined by Motor Neurons and Microglia. *Science*. 2 de junio de 2006;312(5778):1389-92.
 58. Seale P, Rudnicki MA. A New Look at the Origin, Function, and “Stem-Cell” Status of Muscle Satellite Cells. *Developmental Biology*. 15 de febrero de 2000;218(2):115-24.
 59. Yablonka-Reuveni Z, Rivera AJ. Temporal expression of regulatory and structural muscle proteins during myogenesis of satellite cells on isolated adult rat fibers. *Developmental Biology*. 1 de agosto de 1994;164(2):588-603.
 60. Asakura A, Rudnicki MA, Komaki M. Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation. *Differentiation*. 1 de octubre de 2001;68(4):245-53.
 61. Burkin DJ, Kaufman SJ. The $\alpha 7\beta 1$ integrin in muscle development and disease. *Cell Tissue Res*. 1 de marzo de 1999;296(1):183-90.
 62. Luo W, Lin Z, Chen J, Chen G, Zhang S, Liu M, et al. TMEM182 interacts with integrin beta 1 and regulates myoblast differentiation and muscle regeneration. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. 2021;12(6):1704-23.
 63. Manzano R, Toivonen JM, Oliván S, Calvo AC, Moreno-Igoa M, Muñoz MJ, et al. Altered Expression of Myogenic Regulatory Factors in the Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurodegenerative Diseases*. 23 de febrero de 2011;8(5):386-96.
 64. Manzano R, Toivonen JM, Calvo AC, Oliván S, Zaragoza P, Rodellar C, et al. Altered in vitro proliferation of mouse SOD1-G93A skeletal muscle satellite cells. *Neurodegener Dis*. 2013;11(3):153-64.
 65. Eisenberg BR. Quantitative Ultrastructure of Mammalian Skeletal Muscle. En: *Comprehensive Physiology* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2011 [citado 7 de mayo de 2023]. p. 73-112. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cphy.cp100103>
 66. Holloway, G. P., Holwerda, A. M., Miotto, P. M., van Loon, L. J. C. Prioritizing metabolic health in the treatment of skeletal muscle dysfunction. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2018;
 67. Jankovic M, Novakovic I, Gamil Anwar Dawod P, Gamil Anwar Dawod A, Drinic A, Abdel Motaleb FI, et al. Current Concepts on Genetic Aspects of Mitochondrial Dysfunction in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*. enero de 2021;22(18):9832.
 68. Bacman SR, Bradley WG, Moraes CT. Mitochondrial involvement in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Neurobiol*. 1 de abril de 2006;33(2):113-31.
 69. Hervias I, Beal MF, Manfredi G. Mitochondrial dysfunction and amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle & Nerve*. 2006;33(5):598-608.

70. Magrané J, Manfredi G. Mitochondrial Function, Morphology, and Axonal Transport in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Antioxidants & Redox Signaling*. julio de 2009;11(7):1615-26.
71. Shi P, Gal J, Kwinter DM, Liu X, Zhu H. Mitochondrial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 1 de enero de 2010;1802(1):45-51.
72. Golpich M, Amini E, Mohamed Z, Azman Ali R, Mohamed Ibrahim N, Ahmadiani A. Mitochondrial Dysfunction and Biogenesis in Neurodegenerative diseases: Pathogenesis and Treatment. *CNS Neurosci Ther*. enero de 2017;23(1):5-22.
73. Quessada C, Bouscary A, René F, Valle C, Ferri A, Ngo ST, et al. Skeletal Muscle Metabolism: Origin or Prognostic Factor for Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) Development? *Cells*. junio de 2021;10(6):1449.
74. Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet*. 13 de abril de 1963;1(7285):785-9.
75. Hue L, Taegtmeyer H. The Randle cycle revisited: a new head for an old hat. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. septiembre de 2009;297(3):E578-591.
76. Scaricamazza S, Salvatori I, Giacobazzo G, Loeffler JP, Renè F, Rosina M, et al. Skeletal-Muscle Metabolic Reprogramming in ALS-SOD1G93A Mice Predates Disease Onset and Is A Promising Therapeutic Target. *iScience*. 22 de mayo de 2020;23(5):101087.
77. Deseille C, Deforges S, Biondi O, Houdebine L, D'amico D, Lamazière A, et al. Specific Physical Exercise Improves Energetic Metabolism in the Skeletal Muscle of Amyotrophic-Lateral- Sclerosis Mice. *Frontiers in Molecular Neuroscience* [Internet]. 2017 [citado 18 de mayo de 2023];10. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2017.00332>
78. Chen W, Guo L, Li M, Wei C, Li S, Xu R. The pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis: Mitochondrial dysfunction, protein misfolding and epigenetics. *Brain Research*. 1 de julio de 2022;1786:147904.
79. Parone PA, Cruz SD, Han JS, McAlonis-Downes M, Vetto AP, Lee SK, et al. Enhancing Mitochondrial Calcium Buffering Capacity Reduces Aggregation of Misfolded SOD1 and Motor Neuron Cell Death without Extending Survival in Mouse Models of Inherited Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Neurosci*. 13 de marzo de 2013;33(11):4657-71.
80. Laird FM, Farah MH, Ackerley S, Hoke A, Maragakis N, Rothstein JD, et al. Motor neuron disease occurring in a mutant dynactin mouse model is characterized by defects in vesicular trafficking. *J Neurosci*. 27 de febrero de 2008;28(9):1997-2005.
81. Bilstrand LG, Sahai E, Kelly G, Golding M, Greensmith L, Schiavo G. Deficits in axonal transport precede ALS symptoms in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 23 de noviembre de 2010;107(47):20523-8.
82. Kodavati M, Wang H, Hegde ML. Altered Mitochondrial Dynamics in Motor Neuron Disease: An Emerging Perspective. *Cells*. abril de 2020;9(4):1065.
83. Walczak J, Szczepanowska J. [Dysfunction of mitochondrial dynamic and distribution in Amyotrophic Lateral Sclerosis]. *Postepy Biochem*. 2015;61(2):183-90.

84. Wai T, Langer T. Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation. *Trends Endocrinol Metab.* febrero de 2016;27(2):105-17.
85. Ferguson SM, De Camilli P. Dynamin, a membrane-remodelling GTPase. *Nat Rev Mol Cell Biol.* febrero de 2012;13(2):75-88.
86. Tilokani L, Nagashima S, Paupe V, Prudent J. Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays Biochem.* 20 de julio de 2018;62(3):341-60.
87. Taguchi N, Ishihara N, Jofuku A, Oka T, Mihara K. Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission. *J Biol Chem.* 13 de abril de 2007;282(15):11521-9.
88. Hong X, Isern J, Campanario S, Perdiguero E, Ramírez-Pardo I, Segalés J, et al. Mitochondrial dynamics maintain muscle stem cell regenerative competence throughout adult life by regulating metabolism and mitophagy. *Cell Stem Cell.* 1 de septiembre de 2022;29(9):1298-1314.e10.
89. Rogers RS, Tungtur S, Tanaka T, Nadeau LL, Badawi Y, Wang H, et al. Impaired Mitophagy Plays a Role in Denervation of Neuromuscular Junctions in ALS Mice. *Frontiers in Neuroscience [Internet].* 2017 [citado 8 de mayo de 2023];11. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2017.00473>
90. Rambold AS, Kostecky B, Elia N, Lippincott-Schwartz J. Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 21 de junio de 2011;108(25):10190-5.
91. Waterham HR, Koster J, van Roermund CWT, Mooyer PAW, Wanders RJA, Leonard JV. A Lethal Defect of Mitochondrial and Peroxisomal Fission. *New England Journal of Medicine.* 26 de abril de 2007;356(17):1736-41.
92. Bitoun M, Maugendre S, Jeannet PY, Lacène E, Ferrer X, Laforêt P, et al. Mutations in dynamin 2 cause dominant centronuclear myopathy. *Nat Genet.* noviembre de 2005;37(11):1207-9.
93. Irazoki A, Gordaliza-Alaguero I, Frank E, Giakoumakis NN, Seco J, Palacín M, et al. Disruption of mitochondrial dynamics triggers muscle inflammation through interorganellar contacts and mitochondrial DNA mislocation. *Nat Commun.* 6 de enero de 2023;14(1):108.
94. Züchner S, Mersiyanova IV, Muglia M, Bissar-Tadmouri N, Rochelle J, Dadali EL, et al. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet.* mayo de 2004;36(5):449-51.
95. Alexander C, Votruba M, Pesch UEA, Thiselton DL, Mayer S, Moore A, et al. OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat Genet.* octubre de 2000;26(2):211-5.
96. Delettre C, Lenaers G, Griffioen JM, Gigarel N, Lorenzo C, Belenguer P, et al. Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet.* octubre de 2000;26(2):207-10.
97. Joshi AU, Saw NL, Vogel H, Cunnigham AD, Shamloo M, Mochly-Rosen D. Inhibition of Drp1/Fis1 interaction slows progression of amyotrophic lateral sclerosis. *EMBO Molecular Medicine.* marzo de 2018;10(3):e8166.

98. Choi SY, Lee JH, Chung AY, Jo Y, Shin JH, Park HC, et al. Prevention of mitochondrial impairment by inhibition of protein phosphatase 1 activity in amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Death Dis.* 21 de octubre de 2020;11(10):888.
99. Luo G, Yi J, Ma C, Xiao Y, Yi F, Yu T, et al. Defective Mitochondrial Dynamics Is an Early Event in Skeletal Muscle of an Amyotrophic Lateral Sclerosis Mouse Model. *PLOS ONE.* 6 de diciembre de 2013;8(12):e82112.
100. Wang W, Li L, Lin WL, Dickson DW, Petrucelli L, Zhang T, et al. The ALS disease-associated mutant TDP-43 impairs mitochondrial dynamics and function in motor neurons. *Hum Mol Genet.* 1 de diciembre de 2013;22(23):4706-19.
101. Panchal K, Tiwari AK. Mitochondrial dynamics, a key executioner in neurodegenerative diseases. *Mitochondrion.* julio de 2019;47:151-73.
102. Tao Y, Yue Y, Qiu G, Ji Z, Spillman M, Gai Z, et al. Comparison of analytical sensitivity and efficiency for SARS-CoV-2 primer sets by TaqMan-based and SYBR Green-based RT-qPCR. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1 de marzo de 2022;106(5):2207-18.
103. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods.* 1 de diciembre de 2001;25(4):402-8.
104. Scaricamazza S, Salvatori I, Ferri A, Valle C. Skeletal Muscle in ALS: An Unappreciated Therapeutic Opportunity? *Cells.* marzo de 2021;10(3):525.
105. Manzano R, Toivonen JM, Moreno-Martínez L, de la Torre M, Moreno-García L, López-Royo T, et al. What skeletal muscle has to say in amyotrophic lateral sclerosis: Implications for therapy. *British Journal of Pharmacology.* 2021;178(6):1279-97.
106. Loeffler JP, Picchiarelli G, Dupuis L, Gonzalez De Aguilar JL. The Role of Skeletal Muscle in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Brain Pathology.* 2016;26(2):227-36.
107. Gurney ME. Transgenic animal models of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol.* mayo de 1997;244 Suppl 2:S15-20.
108. Zhang S, Hulver MW, McMillan RP, Cline MA, Gilbert ER. The pivotal role of pyruvate dehydrogenase kinases in metabolic flexibility. *Nutrition & Metabolism.* 12 de febrero de 2014;11(1):10.
109. Palamiuc L, Schlagowski A, Ngo ST, Vernay A, Dirrig-Grosch S, Henriques A, et al. A metabolic switch toward lipid use in glycolytic muscle is an early pathologic event in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *EMBO Molecular Medicine.* mayo de 2015;7(5):526-46.
110. Telerman-Toppet N, Coërs C. Motor innervation and fiber type pattern in amyotrophic lateral sclerosis and in Charcot-Marie-Tooth disease. *Muscle & Nerve.* 1978;1(2):133-9.
111. Hegedus J, Putman CT, Tyreman N, Gordon T. Preferential motor unit loss in the SOD1G93A transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of Physiology.* 2008;586(14):3337-51.
112. Dobrowolny G, Lepore E, Martini M, Barberi L, Nunn A, Scicchitano BM, et al. Metabolic Changes Associated With Muscle Expression of SOD1G93A. *Frontiers in Physiology [Internet].* 2018

- [citado 3 de junio de 2023];9. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2018.00831>
113. Okado-Matsumoto A, Fridovich I. Subcellular Distribution of Superoxide Dismutases (SOD) in Rat Liver: Cu,Zn-SOD IN MITOCHONDRIA *. *Journal of Biological Chemistry*. 19 de octubre de 2001;276(42):38388-93.
 114. Ferri A, Cozzolino M, Crosio C, Nencini M, Casciati A, Gralla EB, et al. Familial ALS-superoxide dismutases associate with mitochondria and shift their redox potentials. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 12 de septiembre de 2006;103(37):13860-5.
 115. Xiao Y, Karam C, Yi J, Zhang L, Li X, Yoon D, et al. ROS-related mitochondrial dysfunction in skeletal muscle of an ALS mouse model during the disease progression. *Pharmacological Research*. 1 de diciembre de 2018;138:25-36.
 116. Ashrafi G, Schwarz TL. The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell Death Differ*. enero de 2013;20(1):31-42.
 117. Twig G, Shirihai OS. The interplay between mitochondrial dynamics and mitophagy. *Antioxid Redox Signal*. 15 de mayo de 2011;14(10):1939-51.
 118. Wu S, Zhou F, Zhang Z, Xing D. Mitochondrial oxidative stress causes mitochondrial fragmentation via differential modulation of mitochondrial fission–fusion proteins. *The FEBS Journal*. 2011;278(6):941-54.
 119. Meyer JN, Leuthner TC, Luz AL. Mitochondrial fusion, fission, and mitochondrial toxicity. *Toxicology*. 1 de noviembre de 2017;391:42-53.
 120. Babbar M, Sheikh MS. Metabolic Stress and Disorders Related to Alterations in Mitochondrial Fission or Fusion. *Mol Cell Pharmacol*. 2013;5(3):109-33.
 121. Pradat PF, Barani A, Wanschitz J, Dubourg O, Lombès A, Bigot A, et al. Abnormalities of satellite cells function in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*. 1 de julio de 2011;12(4):264-71.
 122. Scaramozza A, Marchese V, Papa V, Salaroli R, Sorarù G, Angelini C, et al. Skeletal muscle satellite cells in amyotrophic lateral sclerosis. *Ultrastruct Pathol*. octubre de 2014;38(5):295-302.
 123. Bordt EA, Clerc P, Roelofs BA, Saladino AJ, Tretter L, Adam-Vizi V, et al. The Putative Drp1 Inhibitor mdivi-1 Is a Reversible Mitochondrial Complex I Inhibitor that Modulates Reactive Oxygen Species. *Developmental Cell*. 27 de marzo de 2017;40(6):583-594.e6.
 124. Guo X, Disatnik MH, Monbureau M, Shamloo M, Mochly-Rosen D, Qi X. Inhibition of mitochondrial fragmentation diminishes Huntington’s disease–associated neurodegeneration. *J Clin Invest*. 2 de diciembre de 2013;123(12):5371-88.
 125. Qi X, Qvit N, Su YC, Mochly-Rosen D. A novel Drp1 inhibitor diminishes aberrant mitochondrial fission and neurotoxicity. *J Cell Sci*. 1 de febrero de 2013;126(Pt 3):789-802.

9. MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla S1. Cuantificación y calidad del RNA extraído.

ID muestra	Genotipo	Edad	Cantidad RNA (ng/ μ L)	260/280	260/230
OOGA5585	WT	P40	638,3	1,94	2,03
OOGA5587	WT	P40	1039,2	2,02	2,10
OOGA5590	WT	P40	1052,0	2,02	2,17
OOGA5682	WT	P40	593,3	2,01	2,23
OOGA5618	WT	P40	879,1	2,00	2,19
OOGA5623	WT	P40	1004,6	2,00	2,21
OOGA5629	WT	P40	151,3	2,02	2,10
OOGA5688	WT	P40	335,7	1,79	1,08
OOGA5586	SOD1G93A	P40	540,0	1,93	2,01
OOGA5588	SOD1G93A	P40	837,6	1,97	2,07
OOGA5589	SOD1G93A	P40	787,9	2,01	2,21
OOGA5681	SOD1G93A	P40	824,1	2,02	2,15
OOGA5622	SOD1G93A	P40	104,8	2,00	2,17
OOGA5666	SOD1G93A	P40	372,1	1,9	1,10
OOGA5678	SOD1G93A	P40	141,5	1,91	2,02
OOGA5687	SOD1G93A	P40	674,9	1,95	2,17
OOGA5417	WT	P120	560,6	2,01	2,15
OOGA5419	WT	P120	473,6	2,01	2,13
OOGA5444	WT	P120	857,5	2,02	2,17
OOGA5454	WT	P120	559,3	1,99	2,14
OOGA5422	WT	P120	704,9	2,00	2,12
OOGA5428	WT	P120	684,8	1,94	1,44
OOGA5432	WT	P120	772,6	2,02	2,12
OOGA5440	WT	P120	457,2	1,97	2,07
OOGA5418	SOD1G93A	P120	818,4	2,03	2,16
OOGA5426	SOD1G93A	P120	636,0	2,01	2,12
OOGA5427	SOD1G93A	P120	605,2	2,00	1,96
OOGA5436	SOD1G93A	P120	724,3	2,01	2,06
OOGA5521	SOD1G93A	P120	496,7	1,93	1,95
OOGA5527	SOD1G93A	P120	734,9	2,01	1,99
OOGA5529	SOD1G93A	P120	754,2	2,05	2,13
OOGA5541	SOD1G93A	P120	827,2	2,01	2,04

WT: wild type, P40: 40 días de edad, P120: 120 días de edad.

Tabla S2. Composición de los geles de acrilamida utilizados para el Western Blot.

	Gel separador (10%)	Gel concentrador (5%)
Agua mQ (mL)	4,9	6,15
Buffer separador 4x (mL)	2,5	2,5
Acrilamida (mL)	2,5	1.25
SDS 10% (mL)	0,1	0,1
APS 10% (μL)	30	30
TEMED (μL)	15	15

mQ: mili Q o ultrapura, SDS: dodecilsulfato, APS: ammonium persulfate, TEMED: tetramethylethylenediamine.

Tabla S3. Relación de anticuerpos primarios y secundarios utilizados en el Western Blot.

Anticuerpo	Peso molecular (kDa)	Referencia	Dilución
DRP1	80	sc-271583, Santa Cruz	1:250
Fosfo-DRP1	78-82	Cell Signalling Phospho-DRP1 (Ser616) Antibody #3455	1:500
MFN1	86	sc-166644, Santa Cruz	1:500
MFN2	86 (se ve en 50)	sc-515647, Santa Cruz	1:250
OPA1	80-100	Cell Signalling OPA1 (D6U6N) Rabbit mAb #80471	1:1000
GAPDH	37	Cell Signalling GAPDH (D16H11) XP® Rabbit mAb #5174	1:1000
goat anti-Rabbit IgG		31466, Thermo Fisher Scientific	1:5000
Anti-Mouse IgG			1:5000
mouse-IgG Fc BP-HRP			1:5000
mouse-IgGκ BP-HRP			1:5000

DRP1: proteína asociada a la dinamina 1, MFN: mitofusina, OPA1: atrofia óptica 1, GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

Tabla S4. Composición de las soluciones utilizadas para la realización del Western Blot.

Solución	Composición
Buffer de electroforesis 10x	30,27 g de Tris-base, 144,27 g de glicina, 10 g de SDS, 1 l H ₂ Od, pH 8.3
Buffer de electroforesis 1x	100 ml de buffer electroforesis 10x, 900 ml H ₂ Od
Buffer de gel separador 4x	1.5 M Tris-base pH 8,8
Buffer de gel concentrador 4x	0.5 M Tris-base pH 6,8
Buffer de transferencia	50 ml de Tris-glicina 20x, 200 ml de metanol, 750 ml de H ₂ Od
Tris-glicina 20x	29,07 g de Tris-base, 144.13 g de glicina, 1 l H ₂ Od
TBS 10x	24,23 g de Tris-base, 87.75 g de NaCl, 1 l de H ₂ Od, pH 7.5
TTBS 1x	100 ml de TBS 10x, 900 ml de H ₂ Od, 1 ml de Tween-20
Stripping	0,985 g de Tris-HCl pH 6,7, 2 g de SDS, 100 ml H ₂ Od
Tampón de carga 4x	2,5 ml de Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, 2,5 ml de SDS 10%, 2,5ml de 2-Mercaptoetanol, 2,5ml de glicerol, 1 mg de azul de bromofenol

H₂Od: agua destilada, SDS: dodecilsulfato sódico, TBS: Tris-buffered saline, NaCl: cloruro sódico, TTBS: Tween-Tris-buffered saline.

Figura S1. Gráficas para la evaluación de la eficiencia de las parejas de primers.