

Gradu Amaierako Lana / Trabajo Fin de Grado
Medikuntza Gradua / Grado en Medicina

CARACTERIZACIÓN DE UN NUEVO MODELO CELULAR PERIFÉRICO PARA LA INVESTIGACIÓN EN LA ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA

Egilea /Autor:
Adrián Agüeros Irañeta
Zuzendaria / Director/a:
Adolfo López de Munain

© 2018, Adrián Agüeros Irañeta:

Donostia, 2018ko Apirilaren 18a / San Sebastian, 18 de Abril de 2018

Jarri hau GRALaren lehen orri gisa. / Incluir como primera página de la memoria del TFG.

INDICE

1.	INTRODUCCIÓN:	1
2.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS:	9
2.1.	HIPOTESIS:	9
2.2.	OBJETIVOS:	9
3.	MATERIAL Y MÉTODOS	9
3.1.	SÍNTESIS DE LAS PARTÍCULAS VIRALES SHRNA, SHSOD1, SHTDP43, SHFUS	9
3.1.1.	Cultivo de células HEK	9
3.1.2.	Transfección en células HEK	9
3.1.3.	Obtención de virus del sobrenadante de la transfección	10
3.2.	CREACIÓN DEL MODELO CELULAR SILENCIADO	10
3.3.	CARACTERIZACIÓN DE CADA LÍNEA CELULAR	10
3.3.1.	Microscopia óptica	10
3.3.2.	Microscopia electrónica	10
3.3.3.	Análisis de proteínas mediante inmunofluorescencia	11
3.3.4.	Análisis de proteínas mediante Western blot	11
3.3.5.	Determinación de ROS (estrés oxidativo) mediante citometría de flujo	12
4.	RESULTADOS	13
4.1.	CARACTERIZACIÓN DEL MODELO:	13
4.1.1.	Microscopia óptica	13
4.1.2.	Microscopia electrónica	14
4.1.2.1.	Alteraciones mitocondriales	15
4.1.2.1.	Alteraciones en el retículo endoplasmático	16
4.1.3.	Determinación de la densidad mitocondrial por inmunofluorescencia	17
4.2.	ANÁLISIS DEL SILENCIAMIENTO DE LOS GENES TARDBP43, SOD1 Y FUS MEDIANTE LA TÉCNICA WESTERN BLOT	18
4.3.	MEDICIÓN DE ESTRÉS OXIDATIVO	19
5.	DISCUSIÓN	21
6.	CONCLUSIONES:	24
7.	BIBLIOGRAFIA	25

1. INTRODUCCIÓN:

La Esclerosis Lateral Amiotrófica se considera una entidad clinicopatológica clásica que engloba un síndrome complejo de causa desconocida que afecta a casos esporádicos y familiares genéticamente heterogéneos. En Europa y los Estados Unidos, hay 1 o 2 nuevos casos de ELA por año por cada 100.000 personas; el número total de casos es aproximadamente de 3 a 5 por 100.000. Estas estadísticas son globalmente uniformes, aunque hay focos en los que la ELA es más común. La incidencia y la prevalencia aumentan con la edad. En los Estados Unidos y Europa, el riesgo acumulativo de por vida de ELA es aproximadamente 1 en 400. En casos de ELA esporádica, la relación de hombres/mujeres afectados se acerca a 2:1. Mientras que, en la forma familiar, la relación es más cercana a 1:1.¹

Esta enfermedad se caracteriza por la degeneración de motoneuronas en el cerebro y en la medula espinal. Suele comenzar de forma insidiosa con debilidad focal, pero progresa sin demora hasta involucrar a la mayor parte de la musculatura incluyendo el diafragma. Típicamente, la muerte por parálisis respiratoria ocurre en un plazo de entre 3-5 años.^{1,2,3}

Las motoneuronas superiores se agrupan en el córtex motor, mientras que las inferiores se agrupan en el tronco del encéfalo y medula espinal, siendo las encargadas de inervar el músculo. Cuando las motoneuronas corticoespinales fallan se produce rigidez, espasticidad muscular e hiperreflexia, mientras que cuando las motoneuronas inferiores se ven afectadas inicialmente muestran una actividad eléctrica aumentada dando lugar a fasciculaciones, a medida que degeneran, la unión neuromuscular se ve deteriorada dando lugar a atrofia muscular y disminución de reflejos. Por normal general, la musculatura ocular e inervación de los esfínteres no se ve afectada hasta estadios tardíos de la enfermedad.^{1,2,3,4}

La ELA, típicamente, comienza con clínica en alguna de las extremidades, generalmente, de forma distal, en una de las manos (más a menudo la dominante) con amiotrofia global y pérdida de fuerza, sin dolores ni trastornos sensitivos asociados, dando lugar a la ELA clásica o espinal, que supone aproximadamente el 65% de los casos. La progresión en estos pacientes es frecuente, que sigan un mismo

patrón, afectándose la extremidad contralateral a la del debut, para posteriormente afectar en el mismo orden a las extremidades restantes, y finalmente produciendo la afectación bulbar.^{1,2,3,4,5}

Por otro lado, 1/3 de los casos debutan con fasciculaciones de la lengua o el mentón, dificultad para la masticación, la deglución o el habla, lo que es característico de la forma bulbar. En estos casos la evolución suele ser de forma descendente propagándose hacia las partes distales de las extremidades superiores con implicación de los miotomos torácicos, y luego a las extremidades inferiores. En conjunto, el patrón sugiere que la propagación rostral-caudal es más rápida que a caudal-rostral ya que las dificultades de alimentación hacen que el paciente pierda peso rápidamente, lo que se asocia con una evolución más desfavorable. Un pequeño porcentaje de pacientes, padecen una forma más agresiva que debuta con un fallo respiratorio precoz, y cuyo pronóstico es más desfavorable.^{1,2,3,4,5}

Salvo en formas complejas de la enfermedad, las facultades mentales no están afectadas. Sin embargo, hasta un tercio de los pacientes, manifiestan en grado variable defectos cognitivos que afectan a funciones frontotemporales y cerca del 50% de los pacientes con ELA de inicio bulbar desarrollan una DFT (Demencia frontotemporal). En cuanto a la tasa de supervivencia es variable. Aunque un 35% vivirán 5 años o más, la mayoría de los pacientes sobreviven entre 2-5 años tras el diagnóstico.^{1,2,5}

La etiología de ELA es desconocida. En las formas familiares la herencia genética va a ser determinante. Sin embargo, en las formas esporádicas la causa sigue siendo desconocida, interviniendo tanto la vulnerabilidad genética como factores ambientales. Se han realizado numerosos estudios para determinar dichos factores de riesgo habiéndose señalado como potenciales causantes los pesticidas, plomo, tabaco, alcohol, determinadas infecciones fúngicas y víricas, la dieta, ejercicio físico y las radiaciones electromagnéticas.^{2,5,6}

Se han descrito un gran número de genes que confieren cierto grado de susceptibilidad de padecer ELA. Asimismo, tanto en formas familiares como esporádicas los genes más importantes y las mutaciones por orden decreciente de

frecuencia son: C9ORF72, SOD1, TARDBP43 y FUS. Los análisis anatopatológicos reflejan la presencia de depósitos de las proteínas TDP43 (en casi todos los casos excepto en los secundarios a mutaciones en SOD1 y FUS) y FUS (en los casos por mutaciones en FUS) fosforiladas en el citoplasma en el cerebro y médula espinal; característica anatomopatológica que comparte la ELA con la DFT. Las características más relevantes de estos genes son las siguientes:

- C9ORF72: Causa genética más frecuente, está involucrado en funciones de autofagia, transporte vesicular y procesamiento de DNA/RNA. La expansión de un hexanucleótido (GGGGCC) fue descubierta en el cromosoma 9 y relacionada con la DFT y la ELA. Aunque esta expansión está relacionada con el 70% de las formas familiares de ELA, existe una controversia con este gen debida a la existencia de esta expansión en personas sanas.⁷
- SOD1: Es la primera mutación que se encontró (20% de las familiares), está relacionada con mecanismos de regulación de estrés oxidativo, la absorción de glucosa y el metabolismo de los hidratos de carbono.
- TARDBP43: Este gen codifica la proteína TDP-43, que participa en procesos de apoptosis, mantenimiento de la integridad mitocondrial, obtención de glucosa, metabolismo de hidratos de carbono, transcripción, regulación de *splicing* y estabilización del ARNm. Su mutación supone el 4% de los casos familiares.
- FUS: Es una proteína estructural y funcionalmente muy similar a TDP-43, que supone un 4% de los casos familiares. Realiza funciones relacionadas con el procesamiento del DNA/RNA.

Estudios recientes indican que la pérdida de función de estos genes podría ser el factor desencadenante de los mecanismos fisiopatológicos que conducen a la degeneración de las motoneuronas como, la alteración de la autofagia generándose agregados citoplásmicos de las proteínas TDP43 y FUS ubiquitinadas, la excitotoxicidad del glutamato con alteración en la homeostasis del calcio intracelular, alteración del metabolismo energético celular, el estrés del retículo endoplásmico, alteraciones en el transporte axonal y el déficit de factores tróficos neuronales^{2,7} que aunque ninguno de estos mecanismos está reconocido como

primordial y/o único , podrían ocurrir simultáneamente. Todos ellos son posibles dianas terapéuticas contra la neurodegeneración, pero por ahora no existe ningún fármaco verdaderamente eficaz. En cuanto a la excitotoxicidad del glutamato, el Riluzol, antagonista de este neurotransmisor, aunque consigue retrasar ligeramente la evolución de algunas variedades de la enfermedad, no es eficaz en prolongar de manera significativa la supervivencia. Por otro lado, en 2017, se aprobó la utilización de Edaravone, un antioxidante que ha mostrado un descenso menor de la función física en comparación con el placebo, aunque sigue sin ser una terapia que incremente la supervivencia.

Cabe la posibilidad de que uno de los motivos por los cuales aún no se ha conseguido un tratamiento eficaz es la dificultad de investigar la enfermedad en un modelo fiable que refleje el fenotipo de la ELA. Esto es debido a que, hasta la fecha, gran parte de los estudios han ido dirigidos a la investigación en modelos animales, obteniendo grandes resultados en unos campos, como el estudio de la unión neuromuscular, pero con grandes limitaciones, pues el sistema nervioso y el metabolismo animal difieren en gran medida del de los seres humanos, por lo que los resultados obtenidos no son lo suficientemente representativos. Es por esto, por lo que la realización de un modelo celular in vitro a partir de reprogramación de células pluripotenciales y fibroblastos humanos puede ser una buena alternativa, pese a no contar con la ventaja de representar un organismo completo, podría ser una fiel representación de la fisiología y el metabolismo humano patológico.⁷ Hasta la fecha se han realizado numerosos estudios de los diferentes genes en modelos animales llegando a las siguientes conclusiones:

SOD1:

- Modelo de ratón: Fue el primer modelo animal que se ha utilizado para la investigación de esta enfermedad, y pese a que en líneas generales la clínica era bastante similar a la que desarrollan los seres humanos como es en el caso de la mutación de SOD1^{G93A}, existe una relación muy pobre entre el momento del debut de la enfermedad y la forma en la que progresa.^{1,7,8,9,10}

- Modelo de rata: Resultados similares a los obtenidos en el ratón, manteniéndose la pérdida de motoneuronas con la mutación SOD1^{G93A}. Por tanto, este modelo tan solo aventaja al anterior en que, debido al mayor tamaño de la rata, resultaba más sencilla su manipulación a la hora de realizar procedimientos intratecales o intraventriculares.^{7,11}
- Modelo de perro: Es el único mamífero que puede presentar de forma natural una enfermedad similar a la ELA, la Mielopatía Degenerativa Canina. Presentando muchas similitudes, incluso las inclusiones citoplasmáticas típicas de la mutación en SOD1, sin embargo, no se ha establecido que la presencia de esta enfermedad tenga relación alguna con la degeneración específica de las motoneuronas.^{7,12}
- Modelo de Danio rerio (pez cebra): Con la introducción de la mutación se observó pérdida de motoneuronas y de la unión neuromuscular con síntomas motores reflejados en deficiencias en la motilidad.^{7,13}
- Modelo de Drosophila melanogaster (mosca de la fruta): El fenotipo expresado por las moscas sugería una deficiencia motora, con disminución de la transmisión sináptica sin pérdida de motoneuronas. La ventaja de este modelo es su fácil manipulación y la rapidez de aparición de fenotipo.^{7,14}
- Modelo de Caenorhabditis elegans (nematodo): Manifestaban una deficiencia motora difícil de catalogar por la naturaleza de los movimientos del modelo.⁷
- Modelo de cerdo: Con la mutación de SOD1^{G93A}, se observó que los cerdos presentaban dificultad para correr que aumentaba con la edad, pérdida de motoneuronas, inclusiones de SOD1 intranucleares y atrofia muscular. Este modelo es el más representativo de la enfermedad en humanos debido a la proximidad en su escala evolutiva y su filogenética.^{7,15,16}

TARDBP43:

- Modelo de ratón: Se ha observado que la proteína TDP43 se encuentra en agregados citoplasmáticos en personas que padecen ELA, por lo que lo primero que se hizo en este modelo animal fue sobreexpresar el gen, observando que el fenotipo encontrado estaba relacionado de una forma directa con la cantidad de proteína introducida, pero no se pudo establecer

una relación entre las diferentes mutaciones introducidas y los diferentes fenotipos observados. Por otro lado, se trató de ver como se desarrollaría este modelo si se le indujera un silenciamiento en este gen, pero los resultados no fueron los deseados ya que desembocó en una muerte embrionaria precoz. Sí que se han observado claros signos metabólicos en las diferentes mutaciones que sobreexpresan TDP43 con pérdida clara de masa corporal y alteraciones motoras.^{7,17,18,19}

- Modelo de rata: Se ha realizado muy pocos modelos con TDP43 con resultados muy dispares, tanto en tiempo de supervivencia como en los hallazgos neuropatológicos, aunque todos los modelos presentaron cierto grado de parálisis.⁷
- Modelo de Drosophila melanogaster (mosca de la fruta): La sobreexpresión en este modelo condujo a una parálisis rápida y muerte en la etapa larval. Las características de la ELA no fueron claramente demostradas ya que estas moscas murieron rápidamente y no se establecieron inclusiones citosólicas neuronales o pérdida de motoneuronas.^{7,20}
- Modelo de Caenorhabditis elegans (Nematodo): Con este modelo, hasta la fecha tan solo se ha podido demostrar que al introducir mutaciones de TDP43, se producen alteraciones de movimiento, pero sin manifestar las inclusiones citoplasmáticas características.⁷
- Modelo de Cerdo: La sobreexpresión en este modelo ha desembocado en fenotipos agresivos de la enfermedad, reafirmado la toxicidad de estos agregados citoplasmáticos.¹⁵

C9ORF72:

- Modelo de ratón: El primer ratón portador de la repetición del hexanucleótido (GGGGCC) ha sido generado recientemente.⁵ Se ha comenzado introduciendo entre 100 y 1000 copias del hexanucleótido, llegando a la conclusión que esta cantidad es suficiente como para provocar acúmulos de ARN, pero no para causar la disfunción celular que conduce a la enfermedad motora, tal y como ocurre en las personas, pues con tan solo unos centenares de copias ya es suficiente para manifestar la enfermedad.^{1,7,21} Por otro lado,

muy recientemente, se han generado nuevos modelos que parecen que reflejan fielmente muchas de las características de la ELA.²²

- Modelo de *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta): Hasta la fecha, ha sido complicado trabajar con este modelo ya que se ha sugerido que el proceso de introducción del hexanucleótido es más tóxico que la propia de los acúmulos de RNA, produciendo una muerte temprana. Por otro lado, y sin subestimar las limitaciones del modelo, se han observado defectos motores.^{7,23}
- Modelo de *Caenorhabditis elegans* (Nematodo): La delección de C9ORF72 en este modelo ha desembocado en pérdida de motoneuronas y parálisis en el 60% de los modelos.⁷

FUS:

- Modelo de ratón: Se ha trabajado tanto en silenciamientos como en sobreexpresiones. Por un lado, al silenciar FUS en este modelo, los ratones morían en un plazo de 24 horas, presentando anormalidades cromosómicas significativas, y desarrollando un trastorno neuropsiquiátrico que no corresponde a la ELA. Por otro lado, la sobreexpresión de FUS desemboca en un fenotipo agresivo con inclusiones citoplasmáticas, pérdida de motoneuronas y defectos en la unión neuromuscular. Sin embargo, se ha demostrado que un silenciamiento completo de FUS no es suficiente, por sí solo, para desencadenar una degeneración neuronal.^{7,24,25,26,27}
- Modelo de rata: En este modelo se introdujo la mutación FUS^{R521C} desarrollando un fenotipo similar al de la ELA, con la salvedad de que presentaba una evolución demasiado rápida que no se corresponde con lo observado en la ELA, pues esta provocaba parálisis y muerte de los modelos en un plazo de entre 30 y 70 días.^{7,28}
- Modelo de *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta): Al generar este modelo, se observaron discapacidad motora e inclusiones citoplasmáticas, pero al igual que en el modelo anterior resulta complicado de valorar debido a la prematura muerte de modelo.^{7,29}

- Modelo de *Caenorhabditis elegans* (Nematodo): El resultado de este modelo fue una parálisis temprana (primera semana) con una muerte en torno a día 13.^{7,30}

En resumen, hasta la fecha, ningún modelo representa de forma completa la enfermedad que se desarrolla en el ser humano.

Una de las posibles causas de la ausencia de un modelo óptimo es el carácter metabólico que tiene la ELA, como enfermedad periférica y sistémica que afecta tempranamente al sistema nervioso motor, esto es la fibra muscular o la unión neuromuscular, que generaría secundariamente el daño neuronal con las consecuencias clínicas conocidas. En este sentido, el músculo sería uno de los tejidos mayoritariamente afectados en esta enfermedad independiente de la afectación neuronal. La ELA podría, de acuerdo a este enfoque, clasificarse como una enfermedad de fisiopatología descendente (ELA primaria o neurodegenerativa pura) o ascendente (ELA secundaria o metabólica).

Este nuevo punto de vista de la enfermedad precisa un modelo que, por una parte, refleje la naturaleza genética del ser humano, represente un tipo celular que pueda ser el responsable de la sintomatología sistémica como enfermedad metabólica y que esté a su vez implicada en la unión neuromuscular, base del fenotipo motor que se manifiesta en la ELA. Es por ello por lo que en este trabajo se propone la creación de un modelo *in vitro* a partir de células humanas musculares que participan en la unión neuromuscular como una de las formas de representar fielmente el desarrollo de la enfermedad en humanos y en un tejido altamente metabólico.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS:

2.1. HIPOTESIS:

La neurodegeneración de las motoneuronas puede estar en relación con el metabolismo de distintos tipos celulares que le dan soporte. Los genes TARDBP43, SOD1 y FUS, podrían participar en la regulación del metabolismo muscular, y por ello, los silenciamientos de estos genes en distintos tipos musculares constituirían un modelo de ELA.

2.2. OBJETIVOS:

2.2.1. Creación de un nuevo modelo celular in vitro de ELA mediante el silenciamiento de los genes SOD1, TARDBP43 y FUS en mioblastos humanos.

2.2.1.1. Caracterización del modelo

2.2.1.2. Análisis de la relación entre los diferentes genes.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. SÍNTESIS DE LAS PARTÍCULAS VIRALES SHRNA, SHSOD1, SHTDP43, SHFUS

3.1.1. Cultivo de células HEK.

Línea celular HEK 293T

Medio de cultivo DMEM (completo)

3.1.2. Transfección en células HEK

Siembra 3×10^6 células en placa T75 y 10 ml de DMEM completo.

Transfección de plásmidos empaquetadores:

MDL2.55 microg. (SIGMA)

VSVG 1.37 microg. (SIGMA)

REV 0.98 microg. (SIGMA)

10 microg de gen diana ShRNA (SIGMA)

19 microl de turbofect (agente transfectante). (Termofisher).

3.1.3. Obtención de virus del sobrenadante de la transfección.

3.2. CREACIÓN DEL MODELO CELULAR SILENCIADO.

- 3.2.1. Cultivo celular de la línea 82.20. wild type en el medio SGM PromoCell, supplement mix PromoCell, FBS 10%, glutamax 6ml, gentamicina 500µl. Pase/expansión de células: tripsina al 0.05%, DPBS (dulbecco's phosphate buffered saline, (-) CaCl₂, (-) MgCl₂, gibco) y suero fetal bovino al 10%.
- 3.2.2. Infección con las partículas lentivirales ShRNA, ShSOD1, ShTDP43 y ShFUS en la línea 82.20. 500µg de cada especie vírica en 5ml de medio SGM en 300.000 células 82.20. (infección 24horas). Polibrem 4µg/mL.

3.3. CARACTERIZACIÓN DE CADA LÍNEA CELULAR.

3.3.1. Microscopia óptica:

Las imágenes se obtuvieron a través de la cámara digital D90 (Nikon) acoplada al microscopio óptico Eclipse TS100 (Nikon).

3.3.2. Microscopia electrónica:

Tras fijar con glutaraldehído al 3.5%, los cultivos celulares fueron lavados con PBS al 0.1M (pH 7.4) y tratados con tetraóxido de osmio al 2% en PBS al 0.1M (pH7.4) durante 2 horas a temperatura ambiente. Las muestras fueron enjuagadas, deshidratadas con soluciones crecientes de etanol, y teñidas con acetato de uranilo al 2% en un 70% de etanol. Los cultivos celulares deshidratados fueron embebidos en araldita (Fluka). Se realizaron secciones semifinas (1.5 microm. De grosor) con una cuchilla de diamante y fueron teñidas con una solución de Toluidina azul al 1% (Sigma-Aldrich), y se realizaron cortes ultrafinos (70nm de grosor), para ser examinados bajo microscopia electrónica de transmisión Tecnai-Spirit acoplada a la cámara Morada TEM CCD (Soft Imaging System).

3.3.3. Análisis de proteínas mediante inmunofluorescencia:

Las células fueron lavadas con DPBS (pH 7.2, libres de Ca^{2+} and Mg^{2+} , Gibco) y fijadas con paraformaldehído al 4% (PFA) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células fueron lavadas después otras dos veces con DPBS, y bloqueadas usando 0.3% Triton X-100 en PBS más BSA 5% durante 1 hora a temperatura ambiente. Las células fueron incubadas con un anticuerpo primario apropiado diluido en PBST durante 12 horas a 4°C. Después de tres lavados con DPBS (de 5 minutos cada uno), las células fijadas son incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente con 488 anticuerpo secundario donkey anti-mouse Alexa Fluor (Invitrogen; 1:400) diluido en PBST. Las imágenes fueron obtenidas usando un microscopio Nikon Eclipse 80i acoplado a Nikon Digital Sight.

3.3.4. Análisis de proteínas mediante Western blot:

- 3.3.4.1. Extracción de proteínas con sample buffer (volumen total 8ml, tris 2M 1.25ml, glicerol 2ml, ph 7.5, SDS 25% 2.56ml, azul bromofenol 0.04g, 100µl de β-mercaptoetanol al 99%). Calentar el sample buffer a 100° durante 5 minutos.
- 3.3.4.2. Análisis de las proteínas mediante la técnica de Western Blot. Para ello hemos utilizado el Gel Mini Protean TGX Precast Gels, Bio Rad, 4-20%, 15-well comb, 15µl/well, el Running Buffer (Tris 3.03g, glicina 14.4g, SDS 1.5g, H₂O 0.1l), el Transfer Buffer (Tris 3.02g, glicina 14.4g, H₂O csp 0.1l), el Blocking Solution (goat milk 2.5g, TBST csp 50ml), la Membrana Immuno-Blot PVDF Membrane for protein blotting sample, Bio Rad, 7x8.5cm, 0.2µm, TBST (Tris 2M 2.5ml, NaCl 5M 4ml, ph 8, tween 20 en 1/2000ml) junto con Metanol, papel whatman, el marcador de peso molecular Kaleidoscope (precisión plus protein standars kaleidoscope, sample from representative lot run on a 4-20% Tris-HCl gel, Bio-rad), anti cuerpo anti-MyoD (anti MyoD1 (D8 G3) XP Rabbit mAb, cell signaling

1:500), anti cuerpo anti-miogenina (anti Myogenin, Rat mAb, F5D, DSHB, Developmental Studies Hybridoma Bank, 2:500).

Los anticuerpos primarios y secundarios estarán disueltos en una solución de BSA que contiene BSA 0.05G/TBST, NaN3 2 μ l/TBST.

3.3.5. Determinación de ROS (estrés oxidativo) mediante citometría de flujo.

La generación de especies reactivas de oxígeno fue determinada por citometría de flujo tras fijar las células en DHE (dihidroxietidio), el cual se usa para detectar los radicales O₂. Los radicales oxidan a DHE y éste emite entonces una fluorescencia roja. Las células fueron centrifugadas y el pelet resuspendido en 0.2ml de DPBS en un tubo eppendorf con una concentración final de DHE de 3.2 μ M y glucosa 5M. La mezcla fue incubada a oscuras 15min en un baño de agua a 37°. Entonces la suspensión de células fue transferida aun falcon FACS y analizado en el citometro Gauva EasyCyte 8HT (Millipore).

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERIZACIÓN DEL MODELO:

4.1.1. Microscopia óptica:

En las imágenes que se pueden observar a continuación (**Figura 1**) se aprecia las diferentes consecuencias que tienen los silenciamientos de SOD1, TDP43 y FUS sobre nuestro control, ShRNA, a diferentes aumentos.

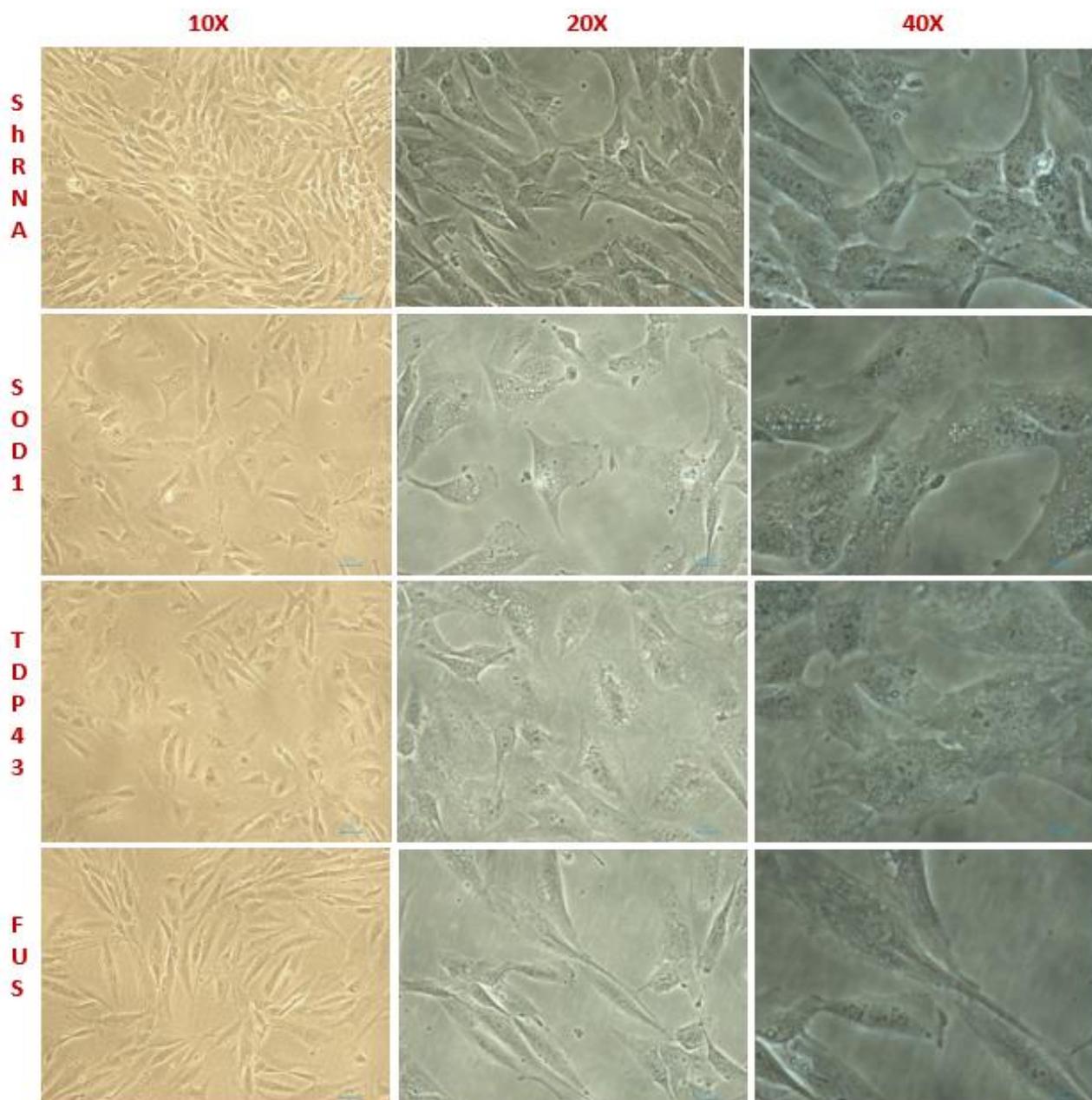


Figura 1. Caracterización a microscopia óptica de ShRNA, ShSOD1, ShTDP43 y ShFUS

En el silenciamiento de SOD1, se observa que las células tienen una composición algo más irregular, siendo estas de tamaño grande con un núcleo más pequeño que el que cabría esperar, y con vacuolas de tamaño grande, lo que nos podría estar indicando que se tratan de células con un grado de estrés considerable.

Por otro lado, en TDP43, se aprecian células muy grandes, al igual que en SOD1, pero con un núcleo grande que presenta unos nucléolos muy marcados. Además, también presenta abundantes vesículas y vacuolas.

Por último, al silenciar FUS, obtenemos unas células con forma fusiforme, sin tanta rotura celular como en los anteriores y con un halo de refringencia alrededor, lo que nos indica maduración celular.

4.1.2. Microscopia electrónica:

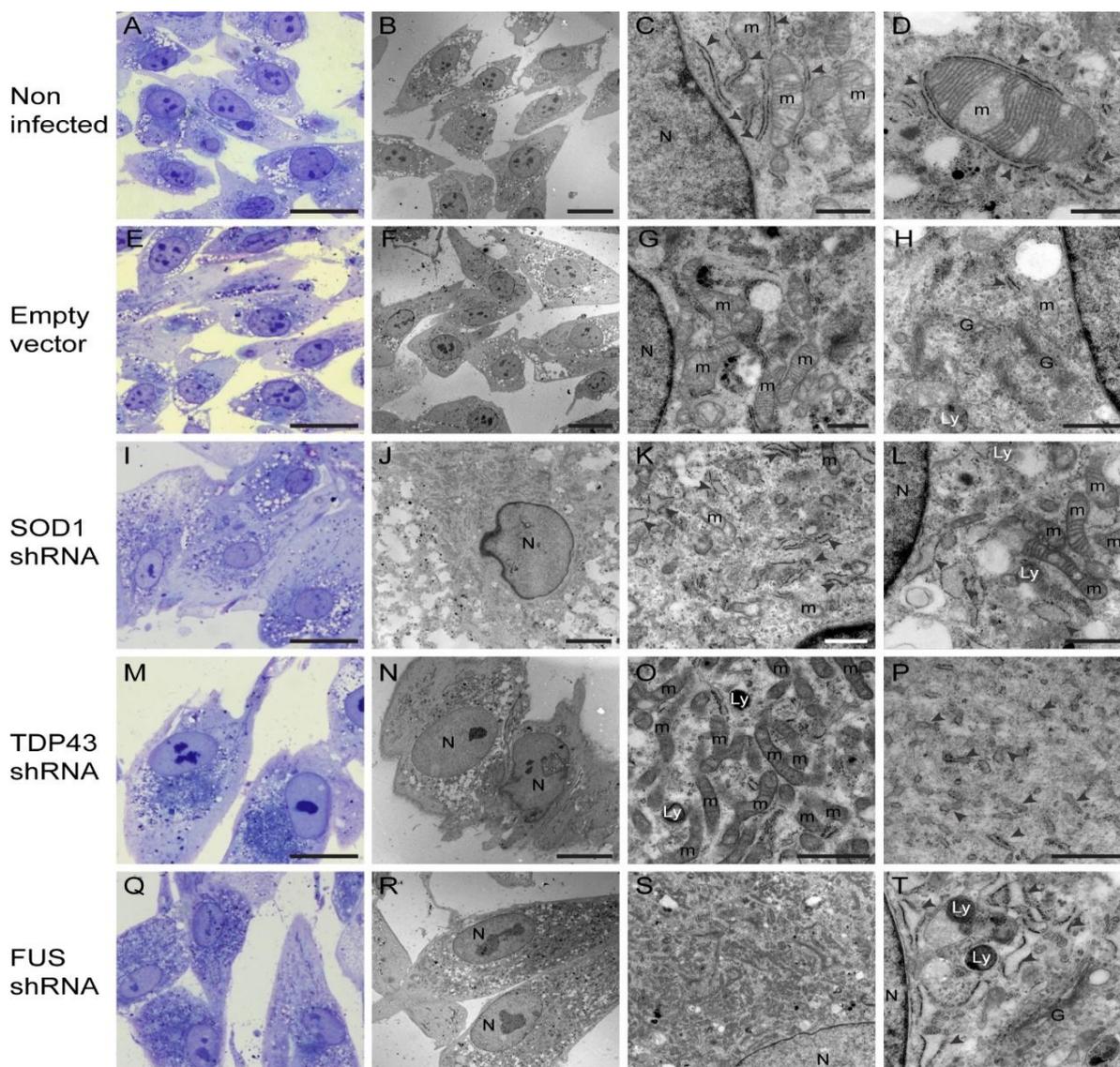


Figura 2. Caracterización a microscopia electrónica.

En estas fotos de microscopía electrónica (**Figura 2**) podemos apreciar los diferentes efectos que tienen cada uno de los silenciamientos con respecto a nuestros diferentes grupos control. A grandes rasgos se aprecia cómo tanto en TDP43 como en FUS, hay un aumento en el número de mitocondrias, mientras que en SOD1 vemos como existe una reducción en el número de aparatos de Golgi, al igual que un cambio de morfología en los retículos endoplásmicos. A continuación, se explican estas diferencias de forma más detallada.

4.1.2.1. Alteraciones mitocondriales:

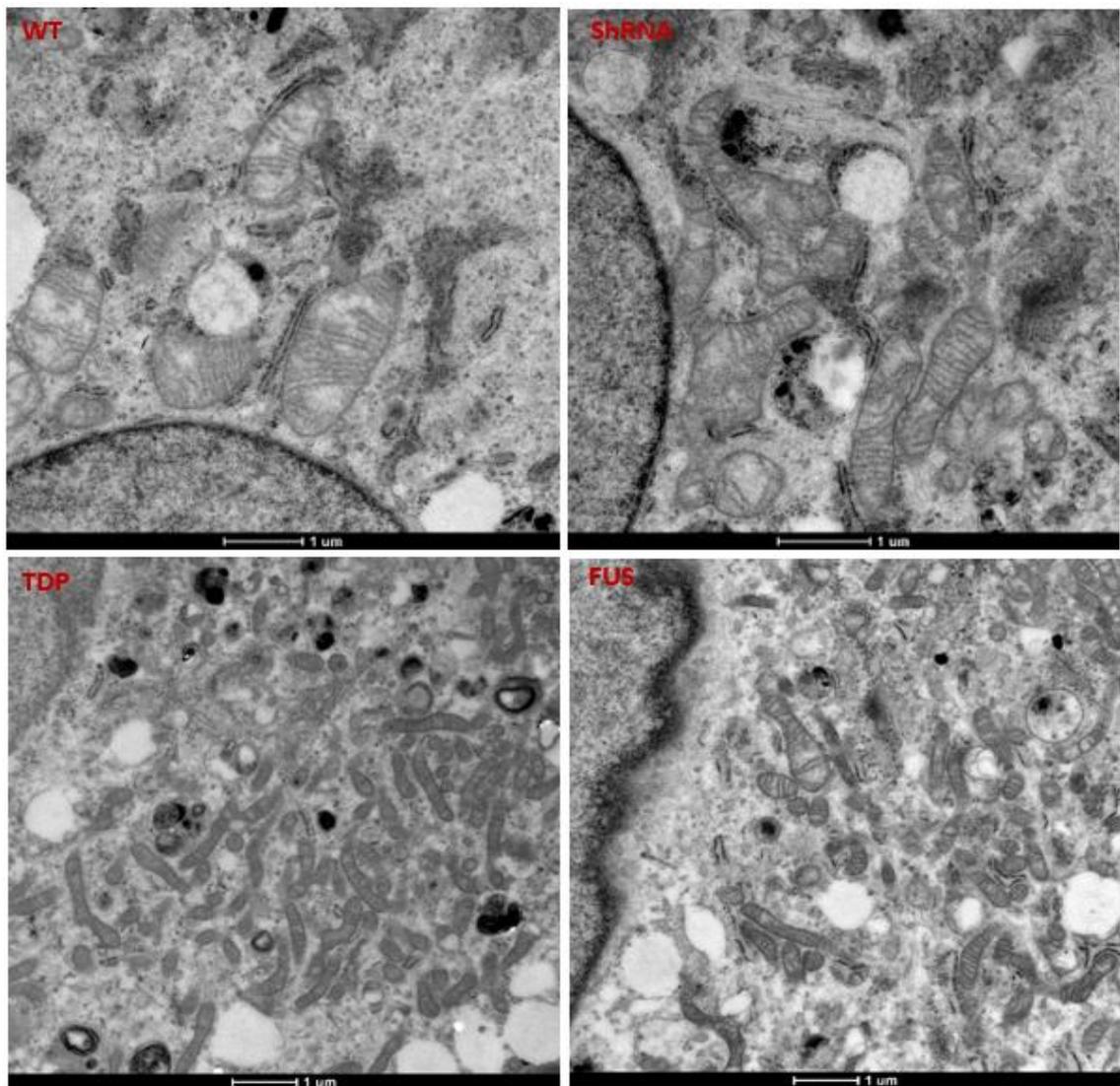


Figura 3. Visualización mediante microscopía electrónica de las diferentes alteraciones mitocondriales.

En estas imágenes podemos apreciar las diferencias entre nuestros controles (WT y ShRNA) y el silenciamiento de TARDBP43 con respecto a las alteraciones mitocondriales (**Figura 3**). Llama la atención, el cambio tanto de morfología como de número, pues tal y como se ve en la imagen con el silenciamiento se produce un incremento importante en el número de estos orgánulos. En cuanto a su morfología, podemos apreciar estas se hacen más pequeñas y alargadas. Pequeñas modificaciones morfológicas son apreciables entre nuestros dos controles, pero estas se hacen más marcadas con el silenciamiento de TARDBP43. Estas características son compartidas cuando observamos el silenciamiento de FUS, con la salvedad de que el aumento en número de las mitocondrias no es tan marcado. En esta comparación no hemos incluido el silenciamiento de SOD1, pues sus alteraciones mitocondriales no suponían un cambio tan marcado como para ser considerado significativo.

4.1.2.1. Alteraciones en el retículo endoplasmático:

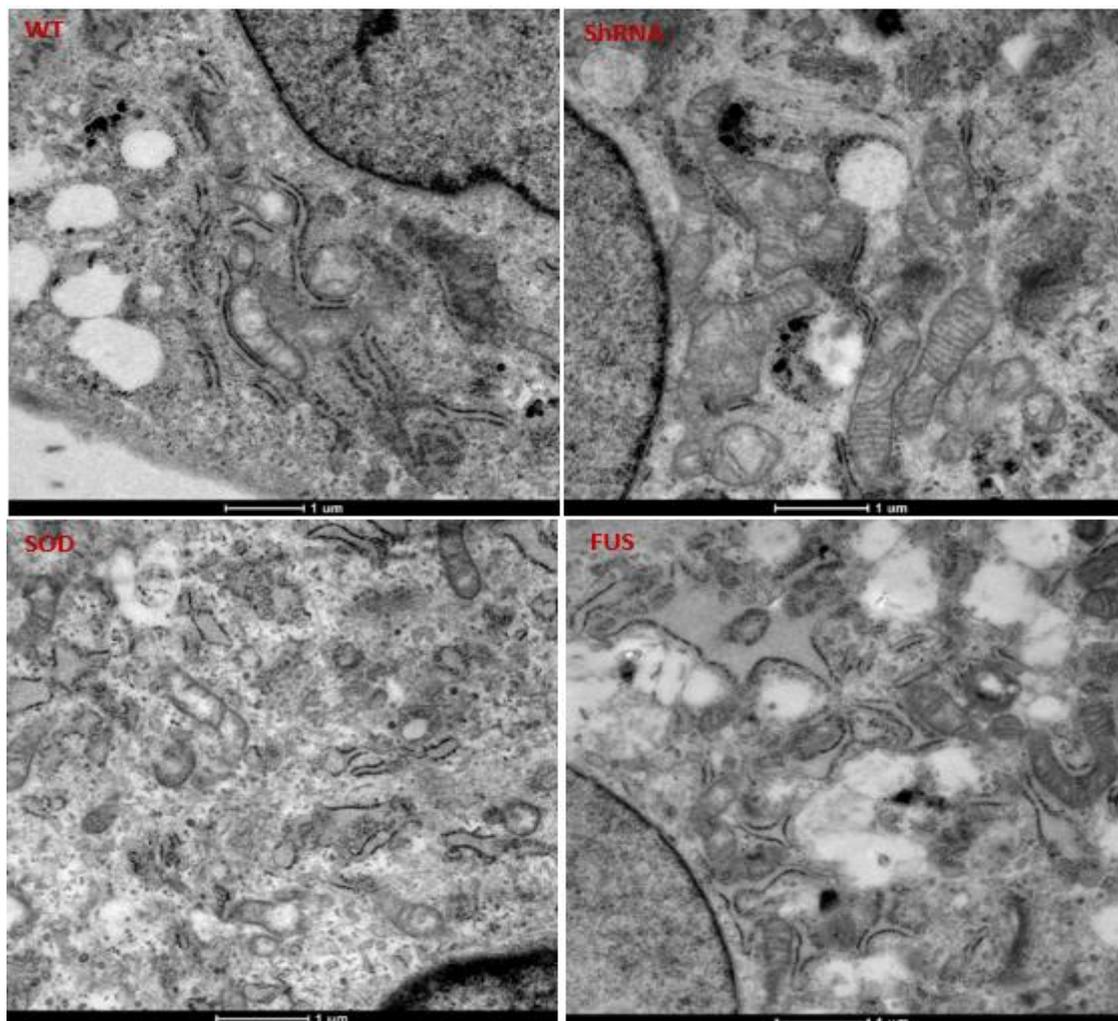


Figura 4. Visualización mediante microscopía electrónica de las alteraciones en el retículo endoplasmático.

En estas imágenes podemos observar, los diferentes cambios morfológicos que se producen en el retículo endoplasmático (RE) con los silenciamientos de SOD1 y FUS (**Figura 4**). En las imágenes superiores, observamos en nuestros controles (WT y ShRNA) como los RE tienen unas características similares, que difieren en gran medida de los observados en las imágenes inferiores (SOD y FUS) donde podemos apreciar que se encuentran dilatados. Además, en la imagen que corresponde a FUS, no solo se aprecia una considerable dilatación, sino que también, un incremento en el número de estos orgánulos.

4.1.3. Determinación de la densidad mitocondrial por inmunofluorescencia:

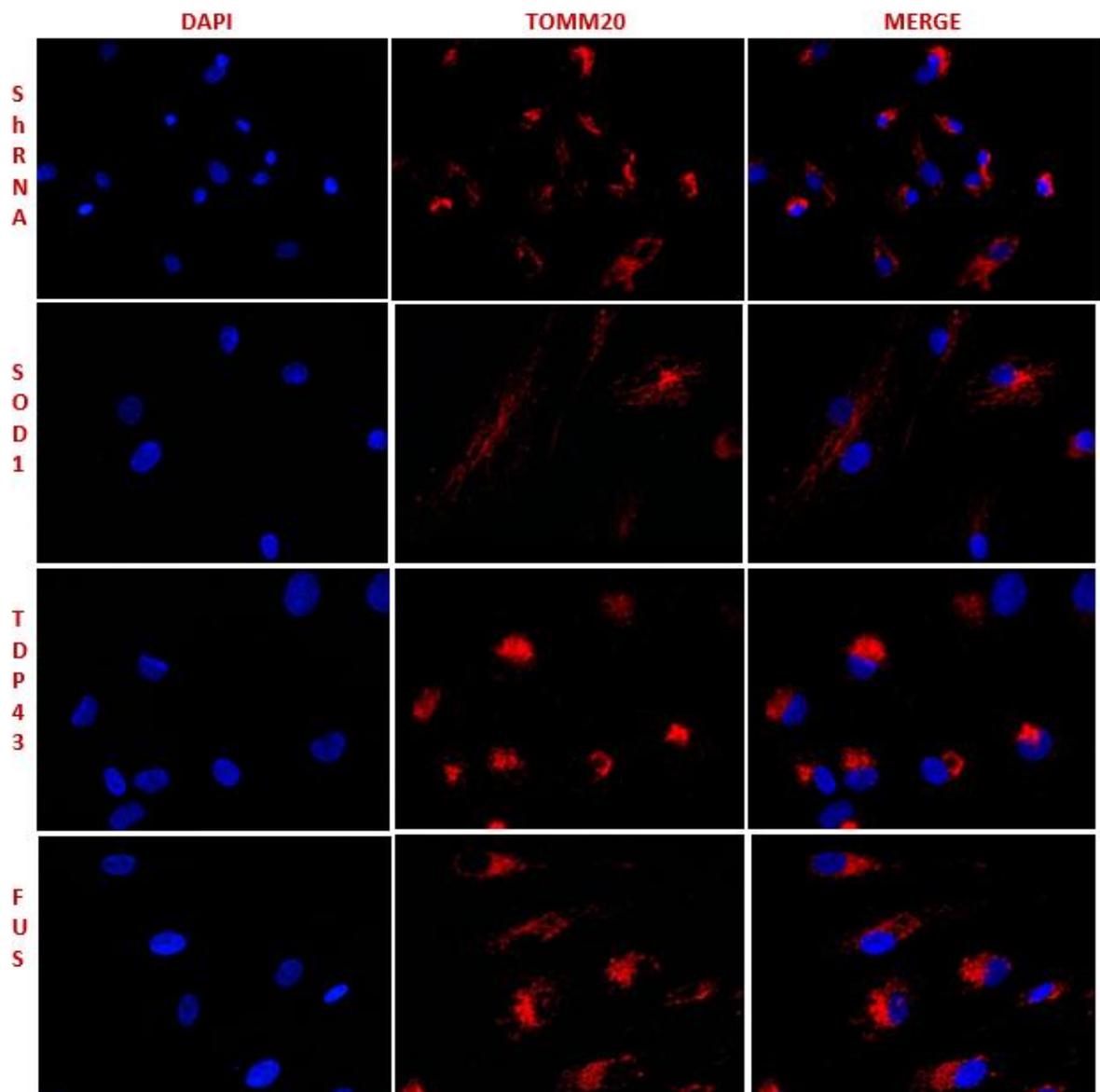


Figura 5. Visualización mediante inmunofluorescencia de la distribución mitocondrial en relación al núcleo.

En estas imágenes de inmunofluorescencia (**Figura 5**) hemos marcado las mitocondrias con TOMM20 (rojo) y los núcleos celulares con DAPI (azul), de esta manera podemos observar uno de los grandes cambios antes mencionados en cuanto a las consecuencias que tienen los diferentes silenciamientos sobre las mitocondrias. Tal y como observamos en las imágenes, en los silenciamientos de TARDBP43 y FUS, se produce un incremento marcado de las mitocondrias que además se disponen alrededor del núcleo. Por el contrario, en el silenciamiento de SOD1 se puede apreciar que no existe mucha variabilidad en cuanto a la cantidad de mitocondrias, aunque sí que existe cierto grado de dispersión en comparación con nuestro control, ShRNA.

A modo de resumen, hemos recogido en la siguiente tabla las principales diferencias observadas en cada uno de los silenciamientos.

Tabla 1. Resumen de las principales diferencias observadas en cada uno de los silenciamientos.

shRNA	Mitocondria	RER	Aparato de Golgi	Lisosomas
No infectado	++ Muy grandes	++ No dilatados	+++	++++
Vector vacío	++ Medio/Grandes	++ No dilatados	++++ Dictiosomas cortos	+++
SOD1	++	++ Corto y dilatado	++	+++ En la periferia
TDP43	++++	+++ Corto y en la periferia	++	+++
FUS	++++†	++++ Dilatado	+++	++

4.2. ANÁLISIS DEL SILENCIAMIENTO DE LOS GENES TARDBP43, SOD1 Y FUS MEDIANTE LA TÉCNICA WESTERN BLOT:

En el siguiente western blot (**Figura 6**) observamos como nuestros silenciamientos se han realizado correctamente. Además, como se expresa en la gráfica, hemos obtenido unos resultados adicionales. Como podemos apreciar, con el silenciamiento de TARDBP43, se produce una disminución de la expresión de FUS y una sobreexpresión de SOD1. Por otro lado, con el silenciamiento de FUS, se produce, al igual que con TARDBP43 una sobre expresión de SOD1, pero sin apreciarse grandes

cambios en la expresión de TDP43. Por último, al silenciar SOD1, no parece que surjan alteraciones significativas en la expresión de los otros dos genes. Con los resultados obtenidos todo parece indicar que estos genes no se comportan de forma independiente si no que están relacionados entre ellos.

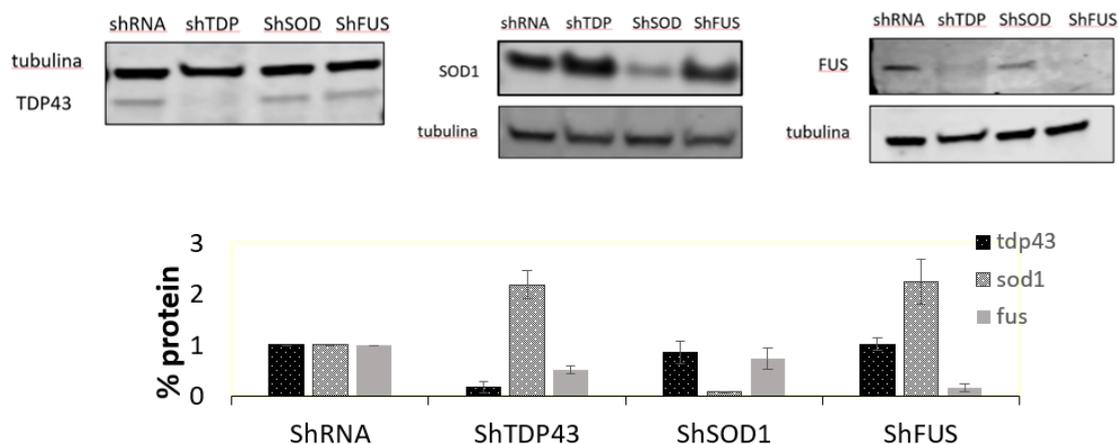


Figura 6. Análisis del silenciamiento de los genes mediante western blot.

Tabla 2. Expresión de proteína con respecto a la línea control ShRNA.

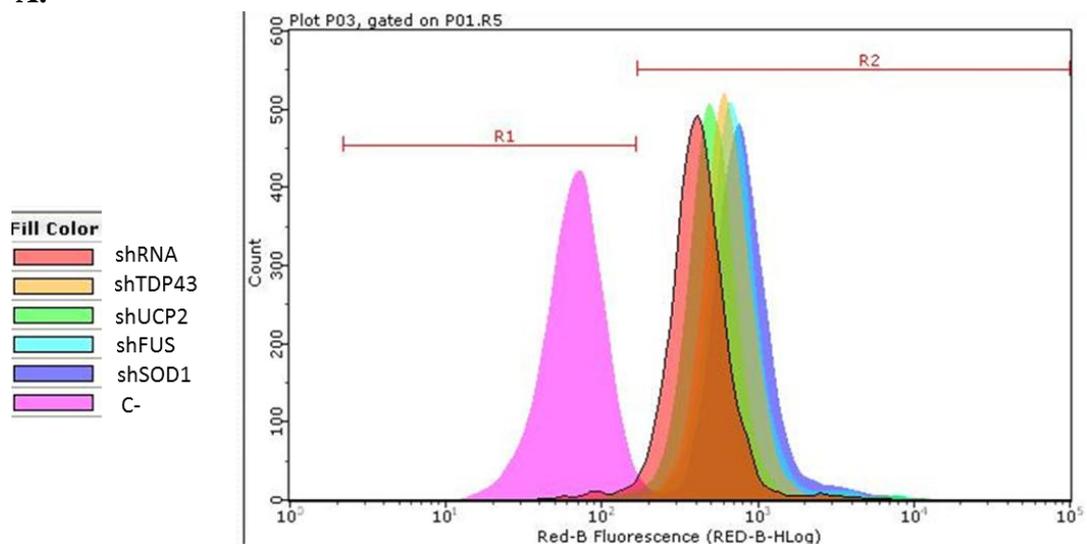
Líneas celulares	TDP43	SOD1	FUS
ShRNA	1	1	1
ShTDP43	0,173198	2,186108	0,513584
ShSOD1	0,849425	0,075125	0,729717
ShFUS	1,019878	2,239266	0,162836

4.3. MEDICIÓN DE ESTRÉS OXIDATIVO.

Mediante citometría de flujo y con una n= 10000 células, se ha medido el estrés oxidativo de las líneas ShRNA, ShTDP43, ShSOD1, ShFUS, la línea control de estrés oxidativo ShUCP2 y la línea WT 8220 sin infección lentiviral. Se observa un aumento de fluorescencia que refleja estrés oxidativo en todas las células silenciadas mediante sendas infecciones lentivirales con respecto al WT lo que indica que el propio método de silenciamiento aumenta el estrés oxidativo.

La línea que mayor fluorescencia (estrés oxidativo) presenta es la línea ShSOD1. En menor medida estarían la línea ShTDP43 y ShFUS cuyo estrés oxidativo aun siendo menor que en la línea ShSOD1, es mayor que en el control de la infección ShRNA y en el control positivo de estrés oxidativo ShUCP2. En definitiva, el orden decreciente de estrés oxidativo en las líneas resulta ser el siguiente: ShSOD1, ShFUS, ShTDP43, ShUCP2, ShRNA (control del proceso de infección), C⁻ (línea control 8220).

A.



B.

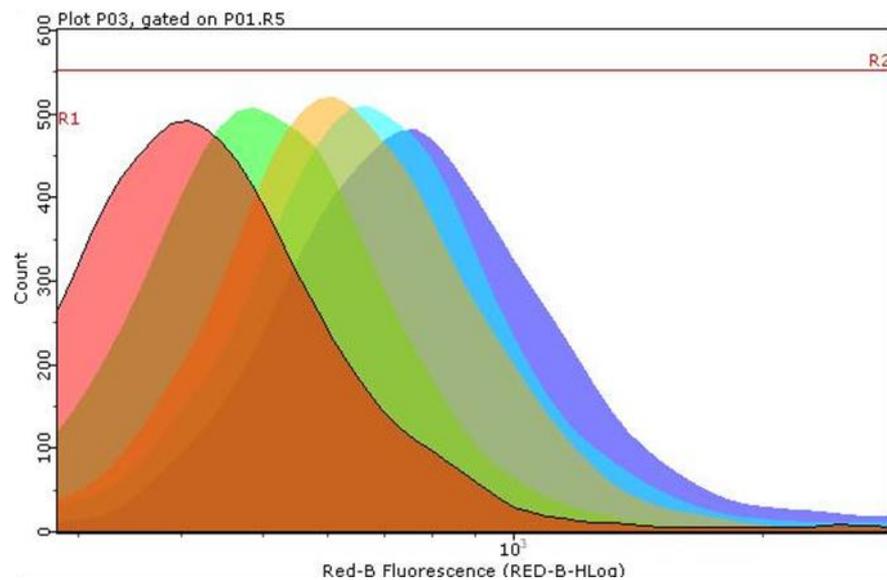


Figura 7. Medición de estrés oxidativo. **A.** En escala reducida. **B.** En escala ampliada.

5. DISCUSIÓN

Dada las alteraciones morfológicas significativas observadas en las células silenciadas, pensamos que los genes TARDBP43, SOD1 y FUS podrían estar implicados en funciones regulatorias de la morfología de las células musculares. La presencia masiva de mitocondrias en la línea ShTDP43 sugiere que este silenciamiento podría estar actuando directamente sobre el metabolismo energético, estos hallazgos indicarían que TDP43 podría tener una función energética primaria a través de la mitocondria. Esto ya ha sido descrito en modelos transgénicos de TDP43, donde se produce un incremento de biosíntesis de mitocondrias como mecanismo de compensación del fallo energético o como un reflejo de disfunciones en procesos tales como la mitofagia y autofagia^{31,32}. El descubrimiento de que ocurre lo mismo en mioblastos abre una nueva perspectiva.

El estrés del retículo endoplasmático es un aspecto de la patología molecular de la ELA que hemos podido observar al encontrar alteraciones en cuanto a su tamaño y localización celular en las líneas en las que se ha silenciado FUS y/o TARDBP43. De esta forma podría sugerirse que FUS tendrían un papel en la homeostasis de los procesos celulares que se llevan a cabo en dicho orgánulo; modificaciones postraduccionales y plegamiento de proteínas, reservorio de Ca^{+2} , etc.

La relación de la expresión proteica de los genes en las diferentes líneas es un dato nuevo que conecta SOD1, que parecía ser independiente de los genes involucrados a su vez en la DFT, como son TARDBP43 y FUS.

Por un lado, el aumento de expresión proteica de SOD1 en las líneas silenciadas ShTDP43 y ShFUS es un resultado realmente interesante que conecta a este con los otros dos. El incremento del estrés oxidativo tras el silenciamiento de ShTDP43 y ShFUS podría generar la sobreexpresión de SOD1 con el objeto de neutralizar el exceso de radicales libres. Aunque por el momento se desconozca la causa de este aumento en ROS en estas líneas silenciadas, todo apunta a que estos genes tendrían (al igual que SOD1, pero de manera indirecta) un papel en el metabolismo energético. El incremento del número de mitocondrias en ShTDP43 y ShFUS podría apuntar a ello. Tomados en conjunto estos resultados preliminares permiten reforzar

la hipótesis del estrés oxidativo como uno de los mecanismos patológico en la ELA. Dentro de esta hipótesis SOD1 estaría directamente implicado en la regulación del estrés oxidativo y se encontraría en el último eslabón de una cadena metabólica. Quedaría por saber la especificidad fenotípica de la disfunción genética de SOD1, es decir porque sus consecuencias no afectan a otros tejidos con elevada demanda energética o porque la población de motoneuronas resulta especialmente vulnerable. Se podría hipotetizar que las familias con ELA y mutación en SOD1 deberían tener alguna otra circunstancia genética que generase esa especial vulnerabilidad para poder desencadenar el fenotipo y que por lo tanto, podría haber personas con mutaciones en SOD1 que nunca desarrollarían ELA. En este sentido, resulta imprescindible conocer cuál es el resultado del silenciamiento condicional de SOD1 in vivo, en neuronas y en músculo de manera independiente en un animal mutante con doble condicionamiento.

Por otro lado, el hecho de que el silenciamiento de TARDBP43 genere una disminución en la expresión de la proteína FUS y que las células con FUS silenciado no presenten cambios de expresión en TARDBP43, podría además establecer una jerarquía funcional posicionando a TARDBP43 en un escalón por encima de FUS en una hipotética vía de señalización en la que ambas proteínas estarían implicadas. En este sentido, los fenotipos debidos a alteraciones en el gen FUS se podrían englobar dentro de los fenotipos TDP43, aunque no tendrían por qué ser idénticos debido a lo posición *upstream* de la proteína TDP43.

Podemos concluir de nuestro trabajo, que los genes SOD1, TARDBP43 y FUS están estrechamente unidos en una vía metabólica cuyo último eslabón es el estrés oxidativo y que por lo tanto no se comportan de forma independiente. El hecho de que, en los pacientes con ELA, se dé mayoritariamente depósitos de TDP43, algo infrecuente en los pacientes con mutaciones en SOD1 y ausente en los pacientes con mutaciones en FUS, sugeriría que en la mayoría de casos esporádicos (con depósitos de TDP43), los mecanismos implicados sean genéticos, ambientales o una mezcla de ambos, actuarían aguas arriba. Todo ello supone que el estrés oxidativo constituiría una diana terapéutica de primer orden, si bien es posible que para cuando la enfermedad manifieste sus primeros síntomas este escenario haya puesto en marcha

un mecanismo de propagación de la enfermedad independiente del evento patogénico original.

Por último, destacar que los resultados obtenidos con la microscopia electrónica e inmunofluorescencia, de forma más evidente en los silenciamientos de FUS y sobre todo de TARDBP43, respaldarían la teoría que reclasifica la ELA además de como enfermedad neurodegenerativa, como una enfermedad periférica con una afectación muscular primigenia. Ello implica la necesidad de analizar con urgencia los eventos moleculares existentes en el músculo de los diferentes modelos genéticos disponibles. Estos modelos podrían servir, al igual que modelos celulares de los propios pacientes, para estudiar la fisiopatología periférica de la enfermedad y reclasificarla en función de las alteraciones en diversos genes.

Todos estos hallazgos, resultan esperanzadores para un fin último, que es el de encontrar un tratamiento que logre frenar o al menos retrasar en gran medida la progresión de la enfermedad aportando un nuevo tejido diana más accesible como es el músculo.

6. CONCLUSIONES:

- El modelo celular de silenciamiento, base de nuestro trabajo, es un modelo sencillo que ha sido eficaz para obtener resultados generadores de nuevas hipótesis respecto a la enfermedad.
- La presencia masiva de mitocondrias en la línea ShTDP43 sugiere que este silenciamiento podría estar actuando directamente sobre el metabolismo energético.
- Las alteraciones que observamos del retículo endoplásmico, más acusadas en la línea ShFUS, refleja uno de los aspectos conocidos de la patología molecular de la ELA, el estrés del R.E.
- La relación de la expresión proteica de los genes en las diferentes líneas es un dato nuevo que conecta SOD1, que parecía ser independiente, de los genes involucrados a su vez en la DFT, como son TARDBP43 y FUS.
- El aumento del estrés oxidativo en las tres líneas indica que la pérdida de función de los genes FUS y TARDBP43 se relaciona con la pérdida de función de la superóxido dimutasa de la línea ShSOD1, con incremento de radicales libres.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Brown, R.H., Al-Chalabi, A. Amyotrophic Lateral Sclerosis N Engl J Med. 2017 Jul 13;377(2):162-172.
2. Zufiría, M., Gil-Bea, F., Fernández-Torrón, R., Poza, J., Muñoz-Blanco, J., Rojas-García, R., Riancho, J. and López de Munain, A. (2016). ALS: A bucket of genes, environment, metabolism and unknown ingredients. *Progress in Neurobiology*, 142, pp.104-129.
3. Gordon, P.H., Cheng, B., Katz, I.B., Pinto, M., Hays, A.P., Mitsumoto, H., Rowland, L.P., 2006. The natural history of primary lateral sclerosis. *Neurology* 66, 647–653.
4. Hardiman, O., van den Berg, L.H., Kiernan, M.C., 2011. Clinical diagnosis and management of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.* 7, 639–649.
5. Murray B., Mitsumoto H. Enfermedades de las motoneuronas superiores e inferiores En: Bradley WG, Daroff RB, Fenichel GM, Jankovic J, editores. *Neurología clínica*. 5ª edición. Barcelona: Elsevier; 2010. 2199-2236.
6. Berciano J., Polo J.M., Infante J., Zarranz J.J. Enfermedades degenerativas espinales y espinocerebelosas En: Zarranz, J. (2013). *Neurología*. Barcelona: Elsevier.
7. Picher-Martel, V., Valdmanis, P., Gould, P., Julien, J. and Dupré, N. (2016). From animal models to human disease: a genetic approach for personalized medicine in ALS. *Acta Neuropathologica Communications*, 4(1).
8. Graffmo KS, Forsberg K, Bergh J, Birve A, Zetterstrom P, Andersen PM, Marklund SL, Brannstrom T. Expression of wild-type human superoxide dismutase-1 in mice causes amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet.* 2013;22(1):51–60.
9. Kaur, S., McKeown, S. and Rashid, S. (2016). Mutant SOD1 mediated pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Gene*, 577(2), pp.109-118.
10. 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.

11. Kashlan ON, Kashlan BN, Oh SS, McGinley LM, Chen KS, Kupfer R, Erman A, Sakowski SA, Feldman EL. Histological Bulbar Manifestations in the ALS Rat. *Neurodegener Dis.* 2015;15(2):121–6.
12. Nardone R, Holler Y, Taylor AC, Lochner P, Tezzon F, Golaszewski S, Brigo F, Trinkla E. Canine degenerative myelopathy: a model of human amyotrophic lateral sclerosis. *Zoology (Jena).* 2015.
13. Babin PJ, Goizet C, Raldua D. Zebrafish models of human motor neuron diseases: advantages and limitations. *Prog Neurobiol.* 2014;118:36–58.
14. Watson MR, Lagow RD, Xu K, Zhang B, Bonini NM. A drosophila model for amyotrophic lateral sclerosis reveals motor neuron damage by human SOD1. *J Biol Chem.* 2008;283(36):24972–81.
15. Wang, G., Yang, H., Yan, S., Wang, C., Liu, X., Zhao, B., Ouyang, Z., Yin, P., Liu, Z., Zhao, Y., Liu, T., Fan, N., Guo, L., Li, S., Li, X. and Lai, L. (2015). Cytoplasmic mislocalization of RNA splicing factors and aberrant neuronal gene splicing in TDP-43 transgenic pig brain. *Molecular Neurodegeneration*, 10(1).
16. Yang H, Wang G, Sun H, Shu R, Liu T, Wang CE, Liu Z, Zhao Y, Zhao B, Ouyang Z, Yang D, Huang J, Zhou Y, Li S, Jiang X, Xiao Z, Li XJ, Lai L. Species-dependent neuropathology in transgenic SOD1 pigs. *Cell Res.* 2014;24(4):464–81.
17. Stallings, N., Puttaparthi, K., Luther, C., Burns, D. and Elliott, J. (2010). Progressive motor weakness in transgenic mice expressing human TDP-43. *Neurobiology of Disease*, 40(2), pp.404-414.
18. Mitchell JC, Constable R, So E, Vance C, Scotter E, Glover L, Hortobagyi T, Arnold ES, Ling SC, McAlonis M, Da Cruz S, Polymenidou M, Tessarolo L, Cleveland DW, Shaw CE. Wild type human TDP-43 potentiates ALS-linked mutant TDP-43 driven progressive motor and cortical neuron degeneration with pathological features of ALS. *Acta Neuropathol Commun.* 2015;3:36.
19. Arnold ES, Ling SC, Huelga SC, Lagier-Tourenne C, Polymenidou M, Ditsworth D, Kordasiewicz HB, McAlonis-Downes M, Platoshyn O, Parone PA, Da Cruz S, Clutario KM, Swing D, Tessarollo L, Marsala M, Shaw CE, Yeo GW, Cleveland DW. ALS-linked TDP-43 mutations produce aberrant RNA splicing and adult-

- onset motor neuron disease without aggregation or loss of nuclear TDP-43. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(8):E736–45.
20. Hanson KA, Kim SH, Wassarman DA, Tibbetts RS. Ubiquilin modifies TDP-43 toxicity in a *Drosophila* model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *J Biol Chem*. 2010;285(15):11068–72.
 21. Koppers M, Blokhuis AM, Westeneng HJ, Terpstra ML, Zundel CA, Vieira de Sa R, Schellevis RD, Waite AJ, Blake DJ, Veldink JH, van den Berg LH, Pasterkamp RJ. *C9orf72* ablation in mice does not cause motor neuron degeneration or motor deficits. *Ann Neurol*. 2015;78(3):426–38.
 22. Liu Y, Pattamatta A, Zu T, Reid T, Bardhi O, Borchelt DR, Yachnis AT, Ranum LP. *C9orf72* BAC Mouse Model with Motor Deficits and Neurodegenerative Features of ALS/FTD. *Neuron*. 2016;90(3):521–34.
 23. Xu Z, Poidevin M, Li X, Li Y, Shu L, Nelson DL, Li H, Hales CM, Gearing M, Wingo TS, Jin P. Expanded GGGGCC repeat RNA associated with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia causes neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(19):7778–83.
 24. Scekic-Zahirovic J, Sendscheid O, El Oussini H, Jambeau M, Sun Y, Mersmann S, Wagner M, Dieterlé S, Sinniger J, Dirrig-Grosch S, Drenner K, Birling MC, Qiu J, Zhou Y, Li H, Fu XD, Rouaux C, Shelkovernikova T, Witting A, Ludolph AC, Kiefer F, Storkebaum E, Lagier-Tourenne C, Dupuis L. Toxic gain of function from mutant FUS protein is crucial to trigger cell autonomous motor neuron loss. *EMBO J*. 2016 May 17;35(10):1077-97.
 25. Scekic-Zahirovic J, Oussini HE, Mersmann S, Drenner K, Wagner M, Sun Y, Allmeroth K, Dieterlé S, Sinniger J, Dirrig-Grosch S, René F, Dormann D, Haass C, Ludolph AC, Lagier-Tourenne C, Storkebaum E, Dupuis L. Motor neuron intrinsic and extrinsic mechanisms contribute to the pathogenesis of FUS- associated amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol*. 2017 Jun;133(6):887-906.
 26. Kino Y, Washizu C, Kurosawa M, Yamada M, Miyazaki H, Akagi T, Hashikawa T, Doi H, Takumi T, Hicks GG, Hattori N, Shimogori T, Nukina N. FUS/TLS deficiency causes behavioral and pathological abnormalities distinct from amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol Commun*. 2015;3:24.

27. Mitchell JC, McGoldrick P, Vance C, Hortobagyi T, Sreedharan J, Rogelj B, Tudor EL, Smith BN, Klasen C, Miller CC, Cooper JD, Greensmith L, Shaw CE. Overexpression of human wild-type FUS causes progressive motor neuron degeneration in an age- and dose-dependent fashion. *Acta Neuropathol.* 2013;125(2):273–88.
28. Huang C, Zhou H, Tong J, Chen H, Liu YJ, Wang D, Wei X, Xia XG. FUS transgenic rats develop the phenotypes of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration. *PLoS Genet.* 2011;7(3): e1002011.
29. Miguel L, Avequin T, Delarue M, Feuillet S, Frebourg T, Champion D, Lecourtois M. Accumulation of insoluble forms of FUS protein correlates with toxicity in *Drosophila*. *Neurobiol Aging.* 2012;33(5):1008.e1001–1015.
30. Vaccaro A, Tauffenberger A, Aggad D, Rouleau G, Drapeau P, Parker JA. Mutant TDP-43 and FUS cause age-dependent paralysis and neurodegeneration in *C. elegans*. *PLoS One.* 2012;7(2):e31321.
31. Magrane J, Cortez C, Gan WB, Manfredi G. Abnormal mitochondrial transport and morphology are common pathological denominators in SOD1 and TDP43 ALS mouse models. (2013). *Human Molecular Genetics*, 23(6), pp.1413-1424.
32. Lee, E., Lee, V. and Trojanowski, J. (2011). Gains or losses: molecular mechanisms of TDP43-mediated neurodegeneration. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(1), pp.38-50.