

Estudio del metabolismo energético muscular en la Esclerosis Lateral Amiotrófica

Mónica Zufiría García

San Sebastián, 2020



Estudio del metabolismo energético muscular en la Esclerosis Lateral Amiotrófica

*Memoria para optar al grado de
doctora presentada por*

Mónica Zufiría García

Directores

**Dr. Francisco Gil-Bea
Dr. Adolfo López de Munain**

San Sebastián, 2020

A mi compañero de vida;

Mi Amor

***“Aquel que actúa conforme a la Verdad,
se acerca a la Luz,
para que se vea que todo lo que él hace
está inspirado por Dios.
(Jn 3,21)”***

“...en general, la respiración no es más que una combustión lenta de carbono e hidrógeno, que es totalmente similar a lo que ocurre en una lámpara o candela encendidas y, desde este punto de vista los animales que respiran son verdaderos cuerpos combustibles que se queman y consumen a sí mismos...Uno podría decir que esta analogía entre combustión y respiración no ha escapado a la observación de los poetas, o más bien de los filósofos de la antigüedad, quienes la han comentado e interpretado. Este fuego robado del cielo, esta antorcha de Prometeo, no representa solamente una idea ingeniosa y poética, es una representación fiel de las operaciones de la naturaleza, al menos en los que respecta a los animales que respiran; uno puede decir, por tanto, con los antiguos que la antorcha de la vida se enciende a sí misma en el momento en que un recién nacido respira por primera vez y no se extingue sino con la muerte”

Armand Seguin y Antoine Lavoisier, 1789 París.

Bueno, por fin estamos en este punto. Muchas cosas quiero decir y no sé por dónde empezar. Empezaré por algo más sencillo para mí en estos momentos, expresando a nivel científico lo que este trabajo ha supuesto en mi interior. Estos años, he descubierto que la ciencia no sólo me gusta, sino que me apasiona. He conocido la sensación de que, aunque estuviera cansada, la necesidad de encontrar respuestas a las preguntas científicas, era mucho más fuerte que el agotamiento que pudiera sentir. La sensación que he experimentado cuando descubría algo, o más bien, lo que el Universo quería mostrarme, ha sido indescriptible. Era como como mirar directamente al rostro de Dios, como yo lo siento, como si me metiera dentro de la célula y la viera en acción, como en la cadena de producción de una fábrica...los mecanismos que tiene para equilibrar su funcionamiento...me emociona...es maravilloso.

Muchas veces, a pesar de que casi ni podía levantarme por las mañanas de lo cansada que me encontraba, tenía a mi ángel de la guarda que me ayudaba a hacerlo, literalmente, y cuando esos momentos de rendición me venían, pensaba en todas las personas que sufren de ELA y en sus familiares, que ponen sus esperanzas en las personas que investigamos...y entonces me volvían las fuerzas con mucha más intensidad aún...y seguía trabajando con más ilusión si cabe. Para mí ha sido un verdadero honor poder aportar mi granito de arena para poder mejorar su vida en un futuro. Desde luego, la actitud de estos enfermos y familiares, con los que he tenido la suerte de coincidir, me han enseñado mucho acerca del coraje de vivir, su sonrisa y su mirada llena de esperanza, han sido la fuerza motriz de este trabajo...sin duda, es increíble como hicieron la prueba de "la pelotita", con qué alegría y cooperación, que lección de vida...nunca lo olvidaré...

Creedme si os digo que cuando trabajaba para obtener resultados por mi vanidad y ego, el Universo decidía no dármelos. Sin embargo, cuando investigaba con el corazón, aparecían los resultados y los más importantes. Esto mismo, lo he experimentado. Pero en realidad, lo maravilloso que tiene este trabajo, es que han participado muchísimas personas en él, por eso creo que es un trabajo bendecido. Creo que la amistad, el compañerismo y la alegría que lo han rodeado, ha sido verdaderamente el secreto de, permitidme la expresión, su éxito.

Así como puedo decir que ha sido fascinante poder descubrir cosas, ha sido extraordinario rodearme de todos vosotr@s. Cada día, he recibido muestras de cariño, ánimo, ayuda y comprensión. Por supuesto, que también alguna que otra llamada de atención porque tengo un poco de carácter y soy un poco desastre a veces...aprovecho pues estas líneas para pedir os disculpas si en algún momento os he hecho sentir mal, no ha sido mi intención en absoluto, creedme que no siempre estoy equilibrada emocionalmente...

Como iba diciendo, en este trabajo mucha gente ha participado en alguna que otra situación. Intentaré acordarme de todos...

Me gustaría empezar, agradeciendo a las enfermeras del Servicio de Neurología del Hospital Donostia por su ayuda, su amabilidad, su espíritu de servicio y su buen hacer, gracias a las cuales pudimos llevar a cabo el ejercicio de "la pelotita"...también agradecer al Servicio de Bioquímica del Hospital Donostia, siempre dispuestas a ayudarme hasta el final, siempre con entusiasmo de participar en este gran proyecto, siempre tan profesionales, siempre tan guays...gracias.

Mis profesores de Medicina que me han ayudado a compaginar la carrera y la tesis, que me han apoyado estos años y que también han tenido mucha paciencia

conmigo, el Dr. Joseba Landa, la Dra. Inmaculada Ruiz, el Dr. José Vicente Lafuente, y muchos más...gracias por ayudarme...también quisiera agradecer a mis compañer@s de clase de Medicina siempre animándome estos años...muchas gracias...

Mi profesora de genética de la carrera de Bioquímica y amiga, la Dra. Ana Cristina Calvo... el destino quiso que nuestros caminos se volvieran a cruzar...es un honor para mí que estés también en mi Tribunal Anacris...gracias por tu cariño y generosidad...todavía me acuerdo de las clases de Mendel...los guisantes no eran lo mío...peo tú lo hacías todo fácil...tú ya venías apoyándome desde Zaragoza... gracias de corazón.

Toda la organización de muestras, pedidos, envíos, organización, apoyo en todo, hubiera sido imposible sin mi querida Miren, trabajadora incansable, nuestra Lab manager, de quien he aprendido, tal y como me lo ha demostrado, que no hay que tener miedo de decir las cosas que a uno le quitan el sueño, que a veces las cosas son más simples de lo que creemos y que lo importante prevalece ante todo lo demás...y con su sentido del humor me he reído muchísimo, Miren me encanta tu ironía!...gracias querida...José, cada día la entrar a trabajar siempre con un "buenos días, Mónica" y una sonrisa, siempre amable conmigo, si necesitaba algo él me lo proporcionaba al instante, que cuando le veía aparecer en el laboratorio con un paquete para mí, sabía que era algún anticuerpo nuevo y me entraba la ilusión de que ya iba a poder analizar algo nuevo...esos "regalitos" entre hielo que me traía...me daban tanta alegría...gracias.

Mi estimada Karmele, cariñosa, amable, eficaz, que a pesar de mis ilegibles notas para hacer compras de reactivos, ella siempre las entendía, y como ya me conoce y está dentro de mi cabeza, antes de que yo me diera cuenta, ella ya sabía que lo que le quería pedir era otra cosa... Siempre sonriendo, siempre amable, siempre, siempre dispuesta a ayudarme hasta el último segundo...un hombro en quien descargar tensión...has escuchado mis inquietudes siempre que lo he necesitado...gracias cariño...has sido muy importante para mí estos años...eres magnífica!

Ya estoy llorando otra vez...

Mis compañer@s y amig@s del Laboratorio... Martxel, Pablo, Gorka E., Alba, María, Anabel, Amaia(s), Leire(s), Camila, Haizpea, Laura(s), Uxoá, Mikel(s), Nanda, Lucía, Claudia, Maitane e Iñaki, Amets, Goros, Pili y David, Ainara y Javi, Ian, Lorea, las superwoman del Biobanco, Naiara, Maribel y Nahikari , todas las técnicas Olatz, Carmen, los de Hepato, Onco, Esclerosis múltiple, Parkinson, etc. TODOS, TODOS sin excepción, siempre animándome...no sabéis lo importantes que habéis sido todos para mí, no sabéis lo mucho que me habéis subido mi autoestima cuando lo necesitaba, no sabéis cuánto me habéis ayudado... cuando me acuerdo de todo lo que he hablado y vivido con cada uno de vosotros, no puedo evitar emocionarme...os llevaré en mi corazón...cómo nos hemos reído...de mis astracanas también...jajaja...me lo he pasado tan bien...mis chic@s del TFG Yosune, Maialen, Adrián...gracias por vuestro apoyo y por valorarme tanto, fue una experiencia maravillosa poder ayudaros...Cristina, me diste mucha vida el año de tu TFG, muchísimo apoyo, creo que gané una buena amiga, ya lo creo que sí!...gracias por valorarme tanto, un placer compartir contigo esas tardes en el laboratorio...esas conversaciones sobre la vida...tú dices que te ayudé pero...yo recibí y recibo mucho más!!...gracias de corazón.

Neia gracias por valorarme tanto, gracias por estar ahí, me has ayudado mucho más de lo que piensas, siempre dulce conmigo, tan comprensiva...confiando en mí así...me has dado tanta fuerza...tú también hasta el último segundo conmigo, poniendo la guinda al pastel para que brille...gracias...Garazi, eres extraordinaria...como persona y como amiga, créetelo...yo no te miento...la alegría de la casa, tú me has enseñado también a reírme de mi misma...mis chicas de oro...imprescindibles en esta odisea...os quiero mogollón...

Bueno...vuelvo a llorar...ahí vamos...ya me he repuesto un poco...

Ana Aiaitui, mi "hermana" mayor...mi apoyo moral, psicológico, tan cariñosa y amable conmigo, sólo espero que yo también lo haya sido contigo...me has dicho cosas tan bonitas sobre mí que no sabía ni cómo reaccionar...y me decía a mí misma: "con qué ojos me mira esta mujer"...además me lo has dicho cada vez que nos cruzábamos por los pasillos, una pasada!...gracias por quererme Ana... yo también te quiero...generosa conmigo SIEMPRE...un verdadero placer trabajar contigo, minuciosa y perfecta! Un verdadero placer!

Mi querido Yon...qué hubiera hecho yo sin ti...sobre todo al final de este camino...ya iba tan rendida que ahí estabas tú, vigilando mis pasos para que no se me pasara nada por alto, para que me saldría todo bien, viviendo conmigo los resultados que sacaba...dejando tus cosas para ayudarme a mí...mi compañero de fatigas...me he sentido súper apoyada por ti en el laboratorio y eso me ha hecho estar más tranquila porque contaba con un chicarrón de Oiartzun que cuidaba de mis células con el mismo mimo que yo...y de mí...cuando me preguntabas: "Mónica has comido?"... y yo: "mmmmmm"...jajajaja...gracias!

Ay Jaione!!!! qué te voy a decir yo a ti...si Yon ha sido mi mano derecha, tú has sido mi mano izquierda y mis dos pies...tú me enseñaste a trabajar, me ayudaste al principio cuando ero todo muy duro para mí, me ayudaste luego y me ayudas ahora...con todo, papeleos burocráticos que tanto me gustan...reactivos, dudas experimentales, dudas existenciales, apoyo emocional...has sido mi hombro donde llorar...hemos llorado, reído,...nos hemos reído tanto pero tanto...sin tu ayuda no hubiera podido llegar hasta aquí, dejándolo todo para ayudarme, has tenido una paciencia conmigo...generosa hasta la saciedad...siempre dispuesta a hacer lo que sea por mí...tenerte a mi lado ha supuesto para mí caminar por una cinta de equilibrista pero con una red que me sostenía si me caía...tú ponías esa red...vales muchísimo...tienes madera de mandar...jajajaja...ya lo creo que sí...sólo espero que pueda llegarte mi agradecimiento desde lo más profundo de mí... "biyotza"...porque tú eres mi "biyo"...te quiero mucho, no lo olvides...

Seguimos...con la lágrima...

Voy a entrar en tema directores...jjjjjjjj...para hablar de mi experiencia con ellos necesitaría otra tesis doctoral de 33 tomos...lo que sí que es cierto es que al final, yo he sentido que mis directores eran cuatro y me siento muy afortunada por ello además, porque cada uno me ha aportado y enseñado cosas especiales cuyo resultado es éste...ellos son los cuatro jinetes del apocalipsis...los cuatro elementos...los cuatro fantásticos...D'Artagnan y los tres mosqueteros...bueno, qué voy a decir, pues voy a empezar con los mosqueteros...Sonia...impresionante, una auténtica "crack", me has ayudado a pensar...a llegar a conclusiones importantísimas en este trabajo, incansable, algunos de tus conocimientos me los has transmitido y gracias a eso las cosas han salido mucho mejor, cariñosa pero firme, un ejemplo de tenacidad, alegre

y siempre sonriendo, me has aportado muchísimo...te lo aseguro, me he sentido muy bien contigo, muy valorada y comprendida y te quiero mucho...gracias...Gorka...el rey de las moscas...y como mosca cojonera que soy, me has sabido llevar muy bien...llegaste en un momento crucial en mi salud mental...a punto de romperme...Gorka llegó y me tendió su mano, ayudándome...a ver las cosas desde otro punto de vista, me has ayudado a relativizar y a mirarme al espejo, a ver, a veces, cosas que no me han gustado de mí misma, pero que era necesario...me has hecho reírme de mi misma mucho y un apoyo emocional fuerte...gracias...Patxi...desde el principio entramos tú y yo, no fue fácil para ninguno de los dos, creo que dirigirme a mí desde el principio no tiene que ser fácil...después de estos años y tras hacer balance creo sinceramente que tú has hecho que se minimizaran los errores y recovecos de este trabajo, por tu perfeccionismo...las preguntas incómodas que me hacías para poder ver los agujeros de la hipótesis, que me daban directamente al ego...me has hecho ver las debilidades o limitaciones de nuestra investigación para mejorarla, a ti te ha tocado estar más en la tierra porque Adolfo y yo nos íbamos...en esas conversaciones profundas sobre el metabolismo, uniendo las ideas, sacando conclusiones fiables, etc. han hecho elevar su valor...al final, fui yo misma la que me volví muy crítica con mi propio trabajo y eso es algo tan importante como cualquier otra cosa...tú me has ayudado a ser más objetiva y realista con los resultados y no irme a las Antípodas...jajaja...gracias!!

Bueno, ahora te toca a ti Adolfo...tengo que respirar hondo para poder escribir...poner de fondo la canción de Centauros del desierto...que junto con otras películas del oeste han amenizado esta tesis...jajaja...tú eres mi mentor...cuando te conocí me hiciste una entrevista de 3 horas...una entrevista fuera de lo normal...preguntas raras tipo: "tu apellido, Zufiría, ¿Proviene de Navarra?", etc...enseguida me di cuenta que eras un hombre diferente...lo que no me imaginaba era lo que iba a ocurrir después...sé que caí en las mejores manos...cuando te pedí permiso para estudiar Medicina...mi sueño... y me dejaste compaginar con la tesis doctoral, nadie normal lo hubiera hecho, por eso creo que tú estás tan loco como yo...o más...creo que más...mucho más...jajajaja...a pesar de todo lo que podía suponer...aquello fue impresionante...confiaste en mí y te digo una cosa, cuando alguien como tú confía en alguien como yo, ese alguien...o sea yo...ya no tiene más remedio que dejarse la piel para estar a la altura de algo así y da igual todo lo demás...y creo que, a veces no sé si era la fuerza para no defraudarte o qué, la que me impulsaba a hacer las dos cosas a la vez sin titubear...tú has estado día a día conmigo, has llevado conmigo el peso, has vivido con entusiasmo cada Western que salía, cada Seahorse, todo...me has ayudado a confiar en mi misma, a valorarme, a entender a los demás, no me ha faltado de nada...es más, he tenido todo en abundancia, todo lo que he necesitado lo he tenido, he tenido libertad para pensar, hacer y comprar, me he sentido LIBRE para investigar...he aprendido mucho, entre otras cosas a escribir mejor, tú has hecho que para mí esta oportunidad no fuese un trabajo, sino un medio para dar rienda suelta a mi mente y mi creatividad, gracias a ti he descubierto para lo que nací...para investigar e investigar. He disfrutado muchísimo, me lo he pasado genial, también me has hecho enfadar ehhehehe!!!...casi me vuelvo loca con las correcciones y erratas, tampoco sabía que era capaz de equivocarme tanto al escribir, increíble...sólo espero no tener erratas en lo único que no me vas a corregir, en estos agradecimientos...has estado conmigo hasta el final al 100%...pero en resumen, D'Artagnan...a veces me asustaba todo lo que confiabas en mí...me abrumaba...tenía miedo de fallarte...espero no haberlo hecho...creo que no! Menos mal...en fin, sé que en un

futuro, esté donde esté, siempre serás mi Director de tesis, mi Mentor...gracias por todo...eres guay...jajaja...ya lo creo!

Bueno...algunos pesos pesados ya me he quitado... sigo con la lágrima...

Ahora es el turno de mi familia, gracias por vuestro apoyo, mis herman@s y cuñadas, sobrinos y mis padres, ama y aita gracias por vuestro amor incondicional, aquí me tenéis escribiendo esta tesis, todo lo que quiero daros hasta el final, son motivos de alegría y júbilo por vuestra hija pequeña, ojalá que os sintáis orgullosos de mí...no sólo por esta tesis doctoral sino por lo que he madurado como persona...todo esto he aprendido de los valores humanos...y sin vuestra educación sobre el esfuerzo, sacrificio y fe en uno mismo, no lo hubiera conseguido...la paciencia que tenéis para oír mis disertaciones sobre mis experimentos...que aguantáis sin poder entender mucho...jajajaja...gracias...os quiero hasta el infinito y más allá...cómo no!!!...

Mi suegra y mis cuñad@s que también me han animado siempre y que me quieren mucho, me han apoyado y ayudado a reírme en momentos difíciles...Mila a ti te ha tocado escuchar un poco más mi cansancio y agotamiento...gracias por ayudarme a relativizar y desconectar...y los infinitos peinados diferentes que me daban alegría!...cada vez que descubría algo guay iba a la "pelu" y me hacías algo...para celebrar!

Mis amig@s...vosotros habéis sido mi sostén...mis maestros...mi hogar...gracias...

Creo que me queda la estrella de la fiesta...mi sol...mi luz...mi razón de vivir...mi Amor...cariño...te dedico esta tesis a ti, es tuya...este esfuerzo, este trabajo...a ti te ha tocado ver la cara oscura de la luna...desde luego nunca me cansaré de decir que estoy en esta situación gracias a ti, desde que me animaste para volver a estudiar...tú has llevado a tus espaldas la carga de una casa, la responsabilidad de que no me faltara de nada, tú has sido quien me ha cuidado, alimentado, levantado, vestido, tú me has llevado y me llevas en brazos...tú te quitas para darme a mí...me has amado como nadie, tú eres mi ángel de la guarda, el amor de mi vida, mi aliento, mi fuerza, mi héroe...la paciencia que has tenido, madre mía!!!...no puedo encontrar las palabras adecuadas para describir lo que siento, quiero que todo el mundo sepa que mi marido es el artífice de todo, todo ha sido por él y gracias a él...me siento la mujer más afortunada del mundo en tener un hombre como tú a mi lado, mi admiración por ti es aún mayor tras ver cómo en este periodo tan duro, te olvidas de ti mismo para darme de ti hasta tu último aliento de fuerza y energía...cariño mío...a mí me darán el título de doctora en... pero tú te has ganado el mayor título que una persona puede aspirar...tu eres Doctor en el Amor...

Siempre te querré...

Y para tod@s, como dice mi marido siempre...**"lo mejor está aún por llegar"**...

Mónica

Índice

Introducción

1. LA ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA (ELA)	17
1.1. Concepto. Nosología. Referencia histórica.....	17
1.2. Epidemiología	18
1.2.1. Factores tóxicos	19
1.2.2. Factores ambientales no tóxicos.....	25
1.3. Neuropatología	27
1.4. Etiopatogenia	30
1.4.1. Visión clásica.....	30
1.4.2. Visión multidimensional: teoría multipaso.....	38
1.4.3. La ELA como enfermedad metabólica	40
1.5. Características clínicas de la ELA.....	48
1.5.1. Variantes clínicas	50
1.5.2. Diagnóstico.....	51
1.5.3. Diagnóstico diferencial.....	55
1.5.4. Evaluación clínica.....	55
1.5.5. Tratamiento	56
1.5.6. Otras aproximaciones terapéuticas.....	57
2. EL MÚSCULO ESQUELÉTICO Y LA ELA	59
2.1. El tejido muscular. Morfología funcional y metabolismo.....	59
2.1.1. Composición del músculo esquelético y tipo de fibras musculares.....	59
2.1.2. Inervación muscular	62
2.1.3. Metabolismo muscular	65
2.2. La atrofia muscular: mecanismos moleculares.....	75
2.3. Afectación del músculo esquelético en la ELA.....	81

Hipótesis

Objetivos

Material y Métodos

1. CULTIVOS CELULARES	97
1.1. Línea 8220 de mioblastos wild type.....	97
1.2. Silenciamiento de TARDBP, FUS y SOD1.....	97
1.3. Caracterización de la ultraestructura de las células silenciadas.....	98
1.4. Determinación de ROS (estrés oxidativo) mediante citometría de flujo....	98
1.5. Cultivo de mioblastos primarios a partir de biopsias musculares	99
2. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	101
2.1. Extracción de proteínas de los cultivos celulares.....	101
2.2. Western blot.....	101
2.3. Inmunofluorescencia.....	105
3. ANÁLISIS METABOLÓMICO 1H-RMN	107
3.1. Gestión de las muestras	107
3.2. Adquisición de los espectros de RMN.....	107
3.3. Procesado de los espectros.....	109
4. ANÁLISIS METABOLÓMICO UPLC-MS	109
5. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE RNA	111
5.1. RT-qPCR (Real time quantitative polymerase chain reaction).....	111
5.2. Análisis de expresión genética (mRNA)	112
6. ANÁLISIS METABÓLICO DE LAS LÍNEAS CELULARES	112
6.1. Estudio de la función mitocondrial.....	113
6.2. Estudio de la función glucolítica.....	115
6.3. Estudio del fenotipo energético.....	117
6.4. Estudio de la tasa de obtención de ATP	118
7. ESTUDIO DEL METABOLISMO ANAEROBIO EN PACIENTES	120
7.1. Test de isquemia.....	120

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO 123

Resultados

1. ESTUDIO DE CASOS-CONTROLES DEL METABOLISMO ANAEROBIO EN LA ELA 127

2. ANÁLISIS DEL METABOLISMO DURANTE DE LA DIFERENCIACIÓN EN CÉLULAS MUSCULARES..... 132

2.1. Modelo celular y estadios de la diferenciación de células musculares . 132

2.2. El metabolismo energético cambia durante del proceso de diferenciación muscular 133

2.3. La inhibición de la glucólisis bloquea el proceso de diferenciación celular, activando el sistema ubiquitin proteasoma 137

2.4. Los factores FoxO1 y FoxO3 median la activación del sistema ubiquitin-proteasoma en respuesta a la inhibición de la glucólisis 140

2.5. La expresión y localización de los factores FoxO1 y FoxO3 cambia durante la diferenciación muscular 141

3. ESTUDIO DEL PAPEL DE LOS GENES TARDBP, SOD1 Y FUS EN LA HOMEOSTASIS MUSCULAR 146

3.1. Expresión y localización celular de las proteínas SOD1, TDP-43 y FUS durante la diferenciación del mioblasto..... 146

3.2. Creación de un modelo celular para el estudio de los mecanismos patológicos asociados a la diferenciación celular muscular en relación con la ELA. 152

3.3. La pérdida de función de TDP-43, SOD1 o FUS produce deficiencias en la diferenciación muscular..... 155

3.4. Aumento de las proteínas pro-atrofia en los mioblastos deficientes de TDP-43 y FUS 161

4. ANÁLISIS DE LA IMPLICACIÓN DE TDP-43, SOD1 Y FUS EN LA REGULACIÓN DEL METABOLISMO ENERGÉTICO MUSCULAR..... 162

4.1. La pérdida de función de TDP-43, SOD1 o FUS en mioblastos humanos afecta a la actividad metabólica celular 163

4.2. Análisis enzimático y metabólico de la maquinaria de oxido-reducción del NAD ⁺ en mioblastos con silenciamiento en genes ELA.....	168
4.3. Translocación de los factores de transcripción FoxO al núcleo en modelos humanos de mioblasto con silenciamiento de TARDBP, SOD1 y FUS	176
4.4. Translocación nuclear de los factores de transcripción FoxO al núcleo en mioblastos primarios derivados de pacientes con ELA.....	181

5. TRATAMIENTO DE LA DISFUNCIÓN METABÓLICA Y MIOGÉNICA GENERADA POR LA PÉRDIDA DE FUNCIÓN DE TDP-43, FUS Y SOD1

190

5.1. La inhibición de FoxO en el núcleo restaura el fenotipo metabólico en las líneas silenciadas y en los mioblastos de pacientes con ELA	190
5.1.1. Efecto de la inhibición de FoxO en la glucolisis.....	190
5.1.2. Efecto del tratamiento inhibitorio de FoxO en las enzimas metabólicas y en los metabolitos de las reacciones que catalizan	193
5.1.3. Estudio del transportador UCP2; el principal enzima cuya expresión desciende con el silenciamiento de TARDBP y que está regulada por FoxO..	196
5.2. La inhibición de FoxO en el núcleo restaura el fenotipo de diferenciación en líneas silenciadas y en los mioblastos de pacientes con ELA	198
5.3. El silenciamiento de FOXO en el núcleo restaura el fenotipo de diferenciación en líneas silenciadas al igual que el inhibidor AS1842856	203

Discusión

1. EL TEJIDO MUSCULAR TIENE COMO PREDOMINANTE EL METABOLISMO GLUCOLÍTICO Y PUEDE SER UN BUEN MODELO PARA ESTUDIAR LOS CAMBIOS METABÓLICOS EN LA ELA

213

2. EL SILENCIAMIENTO DE LOS GENES MENDELIANOS DE LA ELA INDUCE UNA PROFUNDA PERTURBACIÓN METABÓLICA QUE AFECTA PREFERENTEMENTE A LA GLUCOLISIS

214

2.1. Alteraciones del metabolismo oxidativo	215
2.2. Alteraciones en la glucolisis anaerobia.....	216
2.3. El papel de NAD ⁺ y sus posibilidades como diana terapéutica	219
2.4. Limitaciones derivadas del modelo. Vías futuras de estudio.....	221

3. LA PÉRDIDA DE FUNCIÓN DE TDP-43 EN EL MÚSCULO ESTÁ RELACIONADO CON LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN PRO-ATROFIA INDEPENDIENTE DE LA DENERVACIÓN 222

4. LOS GENES MENDELIANOS RELACIONADOS CON LA ELA ESTÁN IMPLICADOS EN EL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN MUSCULAR 223

4.1. Dinámica de TDP-43 y FUS en los procesos de diferenciación 223

4.2. Relaciones entre metabolismo energético y miogénesis 226

5. LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN FOXO SE RELACIONAN CON EL PAPEL DE TDP-43 EN EL MÚSCULO Y PUEDEN TENER RELACIÓN CON LA ELA 228

5.1. Papel funcional de FoxO en el metabolismo 228

5.2. FoxO y miogénesis..... 235

5.3. FoxO y atrofia muscular en la ELA 237

6. LA INHIBICIÓN DE FOXO1 Y FOXO3 PUEDE SER UNA POTENCIAL DIANA TERAPÉUTICA PARA EL TRATAMIENTO DE LA ELA 238

6.1. FoxO y su papel en la neurodegeneración..... 238

6.2. FoxO y cambios metabólico-energéticos en el músculo de pacientes con ELA 238

6.3. La inhibición de FoxO como estrategia terapéutica en la ELA..... 240

6.4. AS1842856: potencial fármaco anti-ELA 244

6.5. Algunos riesgos teóricos inherentes a la terapia inhibidora de FoxO..... 245

7. PROYECCIONES DE FUTURO 246

Conclusiones

Colaboraciones

Financiación

Bibliografía

Abreviaturas

Artículos

Introducción

1. LA ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA (ELA)

1.1. Concepto. Nosología. Referencia histórica.

La ELA es una enfermedad neurodegenerativa que afecta a las neuronas motoras del cerebro, del tronco del encéfalo y de la médula espinal, lo que provoca un cuadro clínico caracterizado por una debilidad muscular progresiva con atrofia de la musculatura esquelética voluntaria a excepción de la musculatura extrínseca ocular y del miocardio.

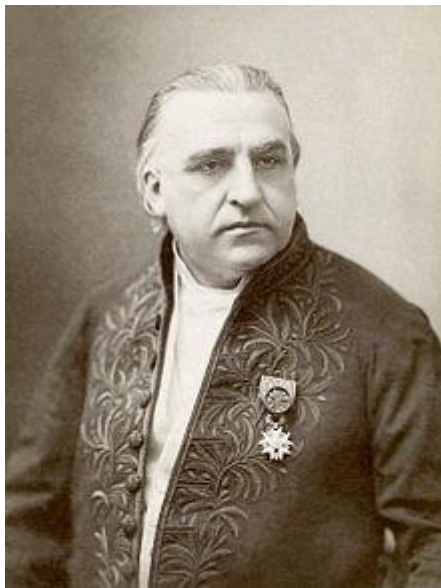


Figura 1. Jean-Martin Charcot (1825-1893)

Esta enfermedad fue descrita en 1874 por Jean Martin-Charcot, el padre de la neurología (**figura 1**). Al igual que en otros descubrimientos de este insigne neurólogo, su descripción fue fruto de una cuidadosa observación clínica y un minucioso trabajo en el laboratorio en el que detallaba la neuropatología de la condición (Charcot and Joffroy, 1869). En los estudios realizados entre 1865 y 1869, Charcot y su colega Joffroy encontraron que las lesiones dentro de la columna lateral de la médula estaban

relacionadas con una parálisis progresiva sin atrofia muscular, mientras que las lesiones del asta anterior de la médula se relacionaban con la parálisis y la atrofia muscular (Goetz, 2000). Estos hallazgos les permitieron profundizar en su método de investigación denominado anatomo-clínico, asentando la idea de que el componente motor de la médula espinal era dual, y que la ubicación de la lesión da lugar a una presentación clínica variable dependiendo del grado de afectación de cada componente ('Œuvre scientifique de J. Babinski', 1934; Kumar *et al.*, 2011). El término "**esclerosis lateral amiotrófica**" recoge las principales características básicas que presenta la condición: hiperplasia glial (**esclerosis**), afectación medular exclusiva del cordón **lateral**, y atrofia muscular (**amiotrófica**). En

reconocimiento a esta contribución estelar, aún hoy en día se conoce a la ELA en Europa como la enfermedad de Charcot, aunque en EEUU, se conoce también como la enfermedad de Lou Gehrig en atención al famoso jugador de béisbol americano de los años treinta del siglo XX que padeció la enfermedad.

1.2. Epidemiología

La incidencia de la ELA muestra una tasa estable en Europa occidental con 2-3 nuevos casos por cada 100.000 habitantes/año y una prevalencia de 4,6 por cada 100.000 (Pradas *et al.*, 2013). El pico de máxima incidencia ocurre entre los 55 y 65 años, con un intervalo muy amplio (15-90 años). La incidencia se incrementa con la edad hasta los 75 años, y luego parece estabilizarse, lo que le diferencia un poco de otras enfermedades neurodegenerativas (Joensen, 2012). La mayoría de estudios epidemiológicos recogen una incidencia más baja en la población no caucásica, sea esta africana o de origen asiático, así como entre los Indios americanos y esquimales (Logroscino *et al.*, 2010; Rojas-Garcia *et al.*, 2012). En la isla de Guam (Pacífico), en la Península de Kii en Corea y en las poblaciones del Valle de Aosta de Italia, se han encontrado mayores cifras de incidencia, relacionadas con factores genéticos y tóxicos medio-ambientales (Plato *et al.*, 2003; Spencer, Palmer and Ludolph, 2005; Chiò *et al.*, 2017; Mimuro *et al.*, 2018).

La mayoría de los estudios epidemiológicos concuerdan en una mayor incidencia en hombres que en mujeres con una proporción 1,2-1,5/1 (Logroscino *et al.*, 2010), aunque parece ser mayor la incidencia masculina en pacientes jóvenes y con una mayor afectación espinal, y mayor incidencia femenina entre pacientes mayores de 60 años con predominio de síntomas bulbares.

La duración promedio de la enfermedad desde el inicio hasta el fallecimiento es de unos 3-4 años con un margen habitual de entre 2 a 5 años, pero alrededor de un 20% de los afectados sobrevive a los 5 años y un

10% puede sobrevivir 10 años o más (Armon, 2004). En términos generales, el 50% de los pacientes fallece en los primeros 3 años desde el diagnóstico. El intervalo de supervivencia puede variar de meses a décadas y no parece depender claramente del fenotipo inicial, aunque las presentaciones de predominio espástico y en pacientes jóvenes tienen una mayor supervivencia que las formas atróficas y las bulbares (Chiò *et al.*, 2009). Los cambios introducidos en la asistencia en los últimos años con las unidades de atención multidisciplinarias han mejorado significativamente la supervivencia.

Los estudios de epidemiología analítica (casos y controles, cohortes anidadas, etc.), así como el análisis de algunas agregaciones locales de casos, han señalado una larga lista de potenciales factores de riesgo. Sin embargo, en ningún caso se ha podido establecer de manera nítida el mecanismo causativo concreto que liga la exposición a estos factores y el desarrollo de la enfermedad. Estos factores pueden clasificarse en factores ambientales tóxicos, otros factores ambientales no tóxicos (físicos, infecciosos o traumáticos) y en factores relacionados con los estilos de vida donde se incluye la alimentación y el nivel de ejercicio físico.

1.2.1. Factores tóxicos

Entre los factores tóxicos ambientales se encuentra la exposición a tóxicos vegetales, la exposición a metales pesados (plomo, mercurio, selenio, zinc) y otras moléculas orgánicas (solventes y pesticidas o productos de la combustión de combustibles fósiles) o la exposición a tóxicos relacionados con drogas recreacionales como el tabaco.

1.2.1.1. Tóxicos ambientales

1.2.1.1.1. Tóxicos vegetales

Las cícadas son una familia de plantas que en algunas partes del mundo son empleadas como alimento fresco o materia prima para la elaboración de harina con alto valor nutricional. Sin embargo, sus semillas contienen

cantidades significativas de principios activos con alta toxicidad como el metilazoximetanol, la β -metilamino-L-alanina (BMAA), β -oxalilamino-L-alanina y la cicasina que pueden producir efectos neurotóxicos. El consumo de cícadas y sus derivados se ha asociado con enfermedades neurodegenerativas, como el complejo demencia-parkinsonismo-esclerosis-lateral amiotrófica y otras enfermedades caracterizadas por alteraciones en la motricidad (Rivadeneira-Domínguez and Rodríguez-Landa, 2014).

En los estudios epidemiológicos realizados en la población de los nativos Chamorros de la isla Guam, que presentaban una incidencia elevada de un cuadro clínico caracterizado por un parkinsonismo y una afectación de motoneurona (MN) (Plato *et al.*, 2003; Murch *et al.*, 2004; Steele, 2005), se descubrió que el cuadro se relacionaba con la ingesta de una neurotoxina (Vega y Bell, 1967), denominada β -N-metilamino-L-alanina (BMAA), presente en las raíces de la planta, *Cycas micronesica*, que utilizaban los Chamorros para hacer harina. Esta toxina proviene de unas cianobacterias simbióticas residentes en las raíces de la planta y que se concentra en el proceso de producción de harina.

La causalidad de esta toxina sobre el cuadro clínico-patológico se vio reforzada por el hallazgo de una elevada concentración de este aminoácido modificado en el tejido *post-mortem* de los cerebros de pacientes guamaneses, no presente en los controles (Murch *et al.*, 2004). Se ha planteado la hipótesis de que la BMAA podría comportarse como un reservorio neurotóxico endógeno, que se liberaría lentamente dentro de los tejidos cerebrales induciendo sus efectos neurotóxicos a lo largo de muchos años (Murch *et al.*, 2004). Adicionalmente, estudios realizados en modelos animales han demostrado que la BMAA se incorpora a las proteínas del cerebro, lo que induce neurotoxicidad por varios mecanismos diferentes: 1) toxicidad glutamatérgica, 2) agotamiento de glutatión, 3) sinergismo con otras neurotoxinas incluyendo el metilmercurio, y 4) por su incorporación errónea a las proteínas a través de la L-seril ARNt sintetasa, produciendo el plegamiento incorrecto de las mismas, agregados de proteínas

intracelulares y eventualmente muerte celular neuronal (Bradley, 2015). A pesar de la búsqueda de polimorfismos de los transportadores de BMAA y la seril-ARNt sintetasa que median el transporte de la BMAA a través de la barrera hematoencefálica y su incorporación a proteínas neuronales, respectivamente, no se ha identificado ningún factor de susceptibilidad genética a la neurotoxicidad de la BMAA (Smith *et al.*, 1992). En cualquier caso, la modificación de los hábitos alimenticios de esta población ha contribuido a una disminución drástica de la incidencia de nuevos casos de ELA en estas agrupaciones, lo que, en opinión de algunos autores, podría sugerir la existencia de otros tóxicos ambientales no descubiertos que explicarían determinadas agrupaciones geográficas de casos de ELA descubiertas a lo largo del mundo (península de Kii, bahía de Cheasepeake, valle de Aosta, bahía de Marsella, etc.) (Plato *et al.*, 2003; Spencer, Palmer and Ludolph, 2005; Chiò *et al.*, 2017; Mimuro *et al.*, 2018).

Existen otros tóxicos vegetales capaces de inducir una afectación de motoneurona como el latirismo, una enfermedad crónica producida por el consumo excesivo y continuo de harina de almorta (*Lathirus sativus*), que cursa con parálisis espástica de los miembros inferiores. En España adquirió un carácter epidémico en los primeros años de la postguerra por consumirse estas harinas debido a la gran escasez de trigo (Giménez-Roldán *et al.*, 2019).

1.2.1.1.2. Metales pesados: plomo, mercurio, zinc y selenio

El papel potencial de estos metales en la degeneración de las neuronas motoras se ha estudiado ampliamente, pero sin llegar a establecer conclusiones definitivas. Entre los metales pesados, el plomo, el mercurio, el zinc y el selenio han sido los más estudiados.

- ✓ *Plomo*. Se han reportado niveles altos de plomo en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y en muestras de sangre de pacientes con ELA (Fang *et al.*, 2010). Sin embargo, en otros estudios la exposición al plomo a dosis bajas, se asoció con una mayor supervivencia (Kamel *et*

al., 2005). La exposición al plomo a bajas concentraciones en ratones que expresan la mutación G93A de superóxido dismutasa-1 ligada a la ELA, *SOD1*^(G93A), se encontró una supervivencia más prolongada y una mayor expresión del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) en el asta anterior asociada con una astrocitosis reducida. El pretratamiento de los astrocitos *SOD1*^(G93A) cultivados con concentraciones bajas de plomo, aumentó la expresión de VEGF y disminuyó significativamente la pérdida de neuronas motoras en el co-cultivo, un efecto que se pierde al neutralizar la acción del VEGF con anticuerpos. Esta acción del plomo sobre los astrocitos podría explicar su paradójico efecto de ralentización de la progresión de la enfermedad en ratones *SOD1*^(G93A) y la mejor supervivencia observada en algunos pacientes con ELA (Barbeito *et al.*, 2010). Asimismo, el plomo puede actuar de forma directa o a través de variaciones epigenéticas de otros genes (Callaghan *et al.*, 2011).

- ✓ **Mercurio** .La exposición al mercurio se ha asociado igualmente con un mayor riesgo de ELA en diferentes estudios epidemiológicos (Brown, 1954; Adams, Ziegler and Lin, 1983; Schwarz *et al.*, 1996). Varias manifestaciones clínicas en una paciente de 38 años con exposición accidental al mercurio y acumulación en el sistema nervioso central (SNC), son muy similares a las reportadas en la ELA clásica (Schwarz *et al.*, 1996). Una única dosis de mercurio en un modelo murino fue seguida por su depósito en las neuronas motoras tanto superiores como inferiores (Arvidson, 1992). Además, los ratones con ELA expuestos al mercurio presentan un curso evolutivo de la enfermedad más rápido y abrupto, lo que sugiere que este metal puede potenciar el desarrollo de la enfermedad en aquellos individuos genéticamente predispuestos o sometidos a otras noxas. El mercurio puede también afectar a la interacción entre la microglía y los astrocitos al influir en la secreción de citoquinas proinflamatorias como la interleucina IL-6 (Bassett, Bach and Chan, 2012).

- ✓ **Selenio.** Las primeras evidencias relacionadas con el selenio y la ELA provinieron de dos investigaciones epidemiológicas que documentaron un mayor riesgo de ELA en poblaciones residentes en regiones seleníferas (Vinceti *et al.*, 1996). Un estudio de seguimiento de 11 años, que incluyó a más de 5.000 italianos, demostró que aquellos que bebían agua del grifo con alto contenido de selenio tenían un riesgo de padecer ELA casi 7 veces mayor que los que no estaban expuestos al selenio (Vinceti *et al.*, 1996). Los modelos experimentales demostraron que el selenio es específicamente tóxico para las neuronas motoras en mamíferos superiores (Casteignau *et al.*, 2006). En particular, se ha encontrado que la intoxicación por selenio daña selectivamente las neuronas motoras en cerdos, con un efecto focal bilateral de las astas ventrales en la médula espinal, y que el estrés oxidativo inducido por el selenio conduce a una disminución de la señalización colinérgica y degeneración de las neuronas motoras colinérgicas (Drechsel *et al.*, 2012; Estevez *et al.*, 2012). Adicionalmente, Maraldi y col., mostraron que la exposición al selenio influye en la acumulación de SOD1 en las mitocondrias, un rasgo característico en algunos modelos de ELA (Maraldi *et al.*, 2011).
- ✓ **Zinc.** La exposición al zinc puede tener también un efecto neurotóxico sobre las neuronas motoras. El zinc aumenta el estrés oxidativo y aumenta la excitotoxicidad, por lo que promueve la muerte de las neuronas motoras (Nutini *et al.*, 2011). Curiosamente, al igual que ocurre con el plomo, mientras dosis altas de zinc se asociaron con una muerte más temprana de las motoneuronas, una suplementación con bajo contenido de zinc prolongó la supervivencia de los ratones *wild type* y *SOD1^{G93A}* (Ermilova *et al.*, 2005).

1.2.1.1.4. Otras moléculas orgánicas (solventes y pesticidas)

Respecto a los pesticidas, hace unos años se realizaron dos meta-análisis en los que se revelaba una asociación positiva entre la exposición a ellos y la ELA (Malek *et al.*, 2012). Asimismo, existe un meta-análisis que reportó un

ligero pero significativo aumento del riesgo del desarrollo de ELA entre las frecuencias extremadamente bajas relacionadas con los campos magnéticos, las cuales inducirían un estrés oxidativo, daño en el ADN y finalmente apoptosis (Falone *et al.*, 2008).

1.2.1.1.5. Productos de la combustión de combustibles fósiles

El Síndrome de la Guerra del Golfo o Síndrome del Golfo, es un conjunto de padecimientos que se han presentado en muchos excombatientes de diversas nacionalidades que participaron en la primera Guerra del Golfo (1991). Es un complejo síndrome clínico caracterizado por una pléyade de síntomas inespecíficos como fatiga, mialgias, dolores articulares, cefaleas, pérdida de capacidades cognitivas y estrés post-traumático, remediando un síndrome de fatiga-crónica-fibromialgia. Su causa se desconoce pero se atribuye a la conjunción de factores psíquicos (estrés postraumático), la exposición a agentes tóxicos volátiles derivados de la combustión de petróleo, y la inhalación de polvo que contenía cianobacterias provocando una exposición significativa a la BMAA y otras cianotoxinas. Además de este cuadro general, se han encontrado indicios que sugieren que los excombatientes y civiles con la patología, tienen asociada una mayor tasa de infecciones específicas en comparación con los controles (Nicolson *et al.*, 2002; Haley, 2003; Horner *et al.*, 2003; Armon, 2004; Murch *et al.*, 2004; Schmidt *et al.*, 2008; Kasarskis *et al.*, 2009).

1.2.1.1.6. Exposición a tóxicos contenidos en drogas recreacionales: el tabaco

No existe una evidencia clara en la relación de la ELA con el tabaco. Se ha relacionado algunos de los componentes del tabaco como el cadmio con la neurodegeneración, compuesto capaz de inhibir fuertemente la enzima SOD1 (Huang *et al.*, 2006). Respecto a otro componente del tabaco, el formaldehído, se ha podido demostrar que causa daño mitocondrial y aumenta el estrés oxidativo (Gurel *et al.*, 2005): dos elementos importantes en la patogenia de la ELA (Robberecht and Philips, 2013).

1.2.2. Factores ambientales no tóxicos

1.2.2.1. Radiocirugía

En un estudio retrospectivo realizado con pacientes con malformaciones arteriovenosas (MAV), se vio que pacientes con angiogénesis perinidal y varias embolizaciones realizadas para reducir esta malformación, que estaban sometidos a procedimientos radioquirúrgicos, tenían más riesgo de padecer ELA. Estos pacientes que desarrollaron ELA, presentaron una concentración del factor VEGF en el suero más baja que los pacientes con MAV que no desarrollaron ELA (Valavanis *et al.*, 2014).

1.2.2.2. Infecciones fúngicas

Algunos trabajos han relacionado la enfermedad con la presencia de infecciones fúngicas silentes en el cerebro. Analizando muestras de distintas regiones del sistema nervioso central de 11 pacientes de ELA, un grupo español descubrió mediante técnicas inmunohistoquímicas y PCR, la presencia de diferentes especies de hongos en cortes de tejido nervioso. Estas especies eran diferentes de unos pacientes a otros, lo que podría explicar la distinta evolución y gravedad de los síntomas. No se han publicado réplicas a este trabajo por lo que el valor de estos hallazgos está por determinar (Alonso *et al.*, 2017). Por otra parte, se sabe que los hongos de los vegetales producen una variedad de neurotoxinas, y que la exposición de las neuronas a las neurotoxinas fúngicas provoca un aumento significativo en la producción de glutamato, de ahí la posible relación con los hallazgos en los pacientes (French, Ludowyke and Guillemin, 2019).

1.2.2.3. Estilos de vida

En este apartado los dos factores más estudiados han sido relacionados con el metabolismo energético: el ejercicio físico y el tipo de alimentación, con sus consecuencias sobre los perfiles glucémico y lipídico.

1.2.2.3.1. Dieta y metabolismo hidrocarbonado y lipídico

La dieta hipercalórica al igual que las dietas ricas en antioxidantes se ha considerado más como agentes protectores que inductores en la ELA. Los datos sugieren que estas dietas pueden ralentizar la progresión de la enfermedad (Al-Chalabi, 2014). Por otro lado, no está claro si las dietas hipocalóricas o la pérdida de peso por insuficiente ingesta, son un factor de riesgo *per se* para inducir la enfermedad. Un dato curioso es que los pacientes con ELA que presentan hiperglucemia o hiperlipidemia parecen tener un mejor pronóstico, mientras que las personas con apariencia atlética y con poca grasa corporal tienen un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad, sugiriendo que un desequilibrio energético podría ser un factor crítico en la etiología de la ELA (Dupuis *et al.*, 2011a). Este aspecto será ampliamente desarrollado más adelante.

1.2.2.3.2. Ejercicio

El ejercicio físico regular y una buena condición física, que se consideran beneficiosos para la salud, podrían ser factores de riesgo para la neurodegeneración (Al-Chalabi and Hardiman, 2013; Eaglehouse *et al.*, 2016). Es bien sabido que el ejercicio vigoroso y repetido genera una situación de estrés que requiere un buen mecanismo neuroprotector para garantizar la integridad y función del sistema neuromuscular. Este estrés puede desbordar este sistema en un individuo vulnerable genéticamente. En línea con esta hipótesis, hay varios estudios de casos y controles que afirman que la actividad física intensa y vigorosa podría estar asociada a la enfermedad en deportistas profesionales (futbolistas, triatletas, esquiadores de fondo) que suelen estar sobrerrepresentados en las cohortes de pacientes con ELA (Beghi *et al.*, 2010; Gotkine, Friedlander and Hochner, 2014), mientras que el ejercicio moderado podría ser un factor protector (Fang *et al.*, 2015). Asimismo, la actividad física vigorosa temprana en la vida se ha asociado con la duplicación del riesgo de mortalidad por ELA, mientras que una actividad física débil está relacionada con una menor mortalidad según un estudio de cohortes (Gallo *et al.*, 2016). Un meta-

análisis realizado en 2018 en una muestra de 1557 pacientes y 2922 controles concluyó que en efecto el ejercicio intenso realizado de manera acumulada antes de los 50 años es un factor de riesgo para el desarrollo de ELA. De hecho, el riesgo de padecer la enfermedad aumenta linealmente con la cantidad de trabajo físico medido por unidades METs (*Metabolic equivalent of task*). Además este riesgo aumentado es independiente de otros factores de riesgo como la edad, el sexo y el consumo de tóxicos (Visser *et al.*, 2018).

1.2.2.4. Traumatismos concusivos de repetición

Se ha establecido una relación entre el riesgo de padecer enfermedades neurodegenerativas y los deportes de contacto, en concreto, la enfermedad de Alzheimer, encefalopatía traumática crónica (ETC) y la ELA, con el fútbol y el fútbol americano (Lehman *et al.*, 2012; Mackay *et al.*, 2019; Smith *et al.*, 2019). Esta asociación se atribuye a las conmociones cerebrales repetitivas que se producen en los golpes durante juego y que pueden dañar las neuronas (Pellman, 2003; Guskiewicz *et al.*, 2005). De hecho, se realizó un estudio de casos y controles en Italia, en el que participaron 377 pacientes con ELA, y como controles, se seleccionaron dos grupos: uno formado por pacientes con enfermedad neurológica no degenerativa, y el otro, con enfermedad no neurológica, ni quirúrgica ni ortopédica, ambos grupos con el mismo número de participantes que el grupo de ELA. Los resultados indicaron que los eventos traumáticos pueden ser factores de riesgo para la ELA (Pupillo *et al.*, 2012). Otro estudio similar que se llevó a cabo Dinamarca, corroboró esta afirmación (Seals *et al.*, 2016).

1.3. Neuropatología

La ELA se caracteriza por los dos tipos de lesiones ya descritas por Charcot como son la pérdida de células tanto del asta anterior como de los núcleos motores del tronco del encéfalo y la esclerosis en las columnas laterales de

la médula espinal. Las contribuciones subsiguientes significativas incluyeron la observación de la pérdida de células gigantes de Betz, de inclusiones eosinofílicas ahora llamadas cuerpos de Bunina, el descubrimiento de inclusiones ubiquitinadas, compuestas principalmente por la proteína TDP-43, y gliosis en los tractos cortico-espinal y corticobulbar (Charcot and Joffroy, 1869; Brodmann, 1909; Bunina, 1962; Lowe *et al.*, 1988; Arai *et al.*, 2006; Jucker and Walker, 2013; Saberi *et al.*, 2015) **(figuras 2 y 3)**.

Estudios más recientes han demostrado que la glía es crucial en la biología de la neurodegeneración de ELA. La astrogliosis reactiva rodea las neuronas motoras degenerativas en pacientes y modelos animales. Los astrocitos presentan niveles elevados de GFAP, proteína ácida fibrilar glial, inclusiones hialinas citoplasmáticas y marcadores de estrés oxidativo. La microglía activada, que responde en las condiciones de estrés neuronal, libera una variedad de citoquinas proinflamatorias, lo que lleva a un mayor grado de inflamación en los cerebros de los pacientes con ELA. Estas moléculas proinflamatorias incluyen, entre otras: el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y la interleucina 1β (IL- 1β). La microglía también libera especies reactivas de oxígeno como el superóxido y el óxido nítrico. Todas estas moléculas liberadas constituyen un ambiente proinflamatorio que a la larga puede dañar a las motoneuronas (McGeer and McGeer, 2002; Boillée *et al.*, 2006; Boillée, Vande Velde and Cleveland, 2006; Yamanaka *et al.*, 2008; Norenberg, Rao and Jayakumar, 2009; McCauley and Baloh, 2019).

Otras características patológicas de la ELA incluyen la vacuolización, visualizada como grandes espacios vacíos cerca de las neuronas motoras y la espongirosis, que son orificios microscópicos que dan a la neurona una apariencia similar a una esponja. En el cerebro de los pacientes no se observan cambios histológicos significativos salvo en casos que presentan formas familiares con demencia fronto-temporal (DFT) (Saberi *et al.*, 2015).

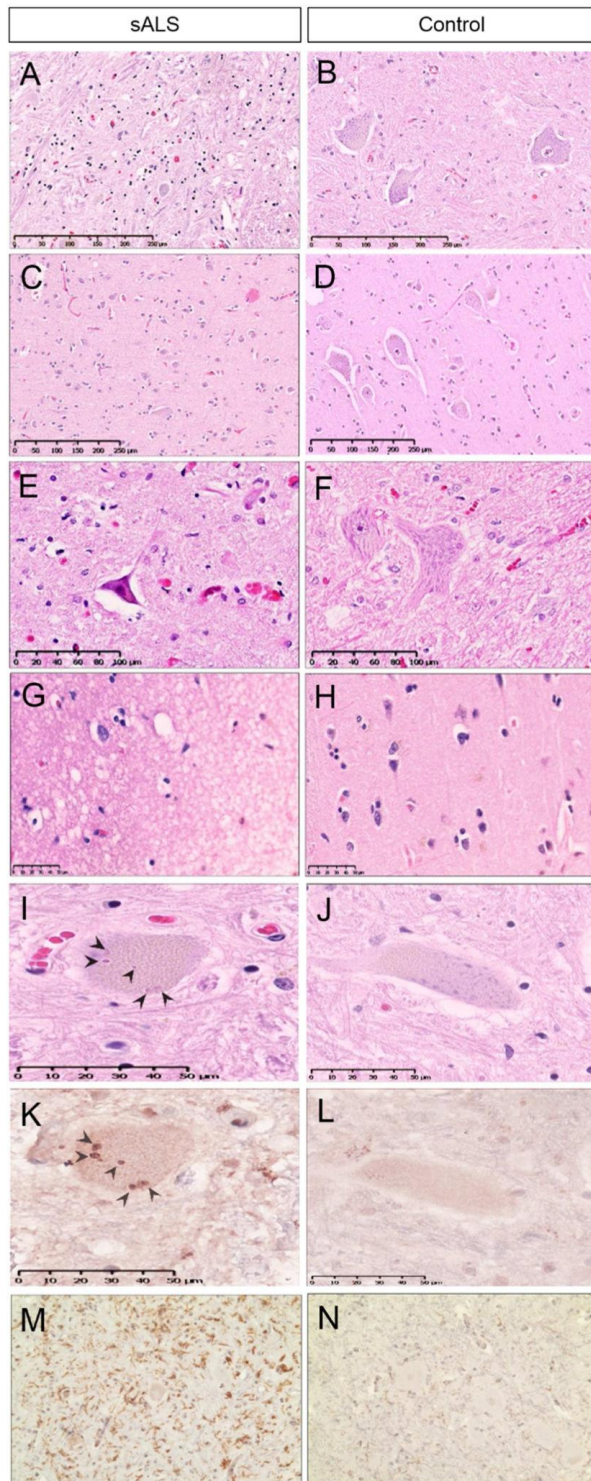


Figura 2. Neuropatología clásica de la ELA. Pérdida de motoneuronas (MN) en pacientes (A) en la médula espinal (C) corteza motora, comparado con controles (B) en la médula espinal (D) corteza motora. Contracción de la motoneurona en pacientes (E) comparado con controles (F). Vacuolización y espongirosis en ELA (G) comparado con el control (H). Cuerpos de Bunina en MNs de ELA (I) y (K) comparado con controles (J) y (L). Activación de la microglía en el asta anterior de la medula espinal en ELA (M) comparado con el control (N). sALS, ELA esporádica. Modificada de Saberi et al., 2015.

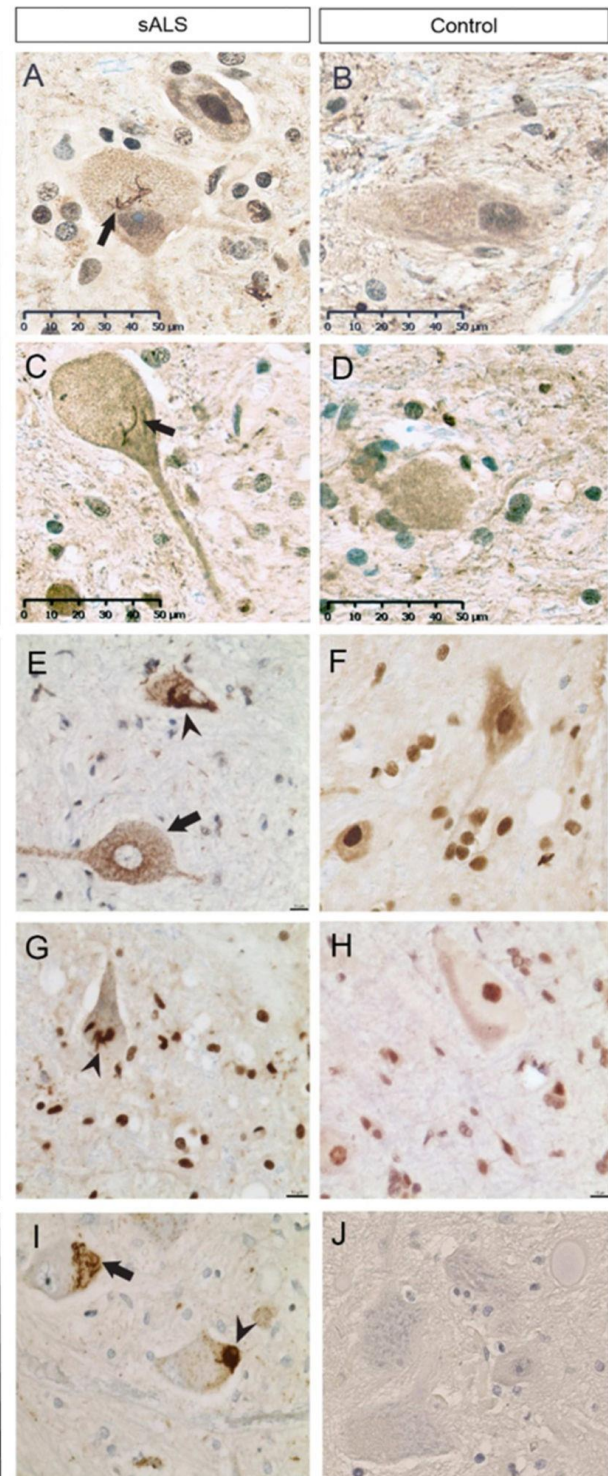


Figura 3. Inclusiones ubiquitinadas en pacientes con ELA en el asta anterior (A) y en las células de Betz de la corteza motora (C), comparado con el control (B,D). Inclusiones citoplasmáticas de la proteína nuclear TDP-43 en la medula espinal y corteza motora en ELA (E,G) comparado con controles (F, H) que presenta TDP-43 nuclear. Inclusiones de TDP-43 fosforilada en pacientes (I) comparado con controles (J). sALS, ELA esporádica. Modificada de Saberi et al., 2015.

1.4. Etiopatogenia

1.4.1. Visión clásica

1.4.1.1. Mecanismos genéticos

Aunque las formas de ELA hereditaria solo representan el 10% de los casos, en los últimos 30 años se han descubierto una gran cantidad de genes asociados a la ELA. Por una parte, están los genes asociados a las formas mendelianas transmitidas con patrón de herencia autosómica dominante, recesiva o ligada al cromosoma X, y por otra parte están los genes que no siendo causativos *per se* incrementan el riesgo de padecer la enfermedad. En estos últimos se incluyen polimorfismos no patogénicos que interactúan con los factores ambientales a través de cambios epigenéticos. Todos estos genes, tanto los causativos como los que aportan susceptibilidad, están involucrados en diversas funciones celulares esenciales como: el procesamiento del ADN/ARN, la autofagia, el transporte vesicular, el estrés oxidativo y el metabolismo energético (Mancuso and Navarro, 2015) (**figura 5**).

1.4.1.1.1 Genes causativos. Formas mendelianas de ELA

✚ **SOD1 (*Superoxido dismutase 1*)**. *SOD1* fue el primer gen descubierto asociado a las formas familiares (Rosen *et al.*, 1993). Las mutaciones en este gen son responsables del 20% de las ELAs familiares. *SOD1* es una enzima compuesta por 153 aminoácidos, cuyas mutaciones, más de 150 descritas (Andersen and Al-Chalabi, 2011), se ha visto que son patogénicas con un patrón de transmisión dominante excepto una de ellas, D90A, descubierta en la población escandinava, que es recesiva (Robberecht and Philips, 2013). Esta proteína participa en el aclaramiento de los radicales libres disminuyendo el estrés oxidativo. Las mutaciones en *SOD1* inducen un mal plegamiento en la proteína con lo que se forman agregados ubiquitinados que escapan a los sistemas regulatorios degradativos y de limpieza celular: la autofagia y el proteasoma (Bendotti *et al.*, 2012). También se ha visto que los propios

agregados tienen un efecto tóxico que dificultan dicho proceso. En modelos animales portadores de alguna mutación de SOD1 se han visto alteradas otras funciones celulares como la producción de energía mitocondrial y el transporte axonal. De hecho, mutaciones en este gen se relacionan con un cambio metabólico en las fibras musculares glucolíticas, como evento patogénico temprano en un modelo murino de ELA (Palamiuc *et al.*, 2015), de igual manera que la pérdida de función de dicho gen se relaciona con alteraciones en la glucolisis, gluconeogénesis y lipogénesis hepática (Wang, Jiang and Lei, 2012b). La proteína normal SOD1 forma agregados provocados por un estrés oxidativo ya presente en pacientes, y estos agregados son incluso más tóxicos que los agregados de la proteína mutante (Ezzi, Urushitani and Julien, 2007). De hecho, se han encontrado agregados de SOD1 en motoneuronas de pacientes con ELA esporádica, en ausencia de mutación en dicha enzima (Bosco *et al.*, 2010). Este hecho constituye un nexo de unión entre las formas familiares y esporádicas de la ELA entre el estrés oxidativo y la consiguiente agregación de SOD1.

- ✚ **TDP-43 (*Transactive response DNA binding protein 43*)**. TDP-43 se expresa de forma ubicua en el organismo y tiene una autorregulación transcripcional en el núcleo. Esta proteína generalmente localizada en el núcleo actúa regulando la transcripción de genes, el procesamiento de ARN, unos 6.000 ARNm, tanto de su *splicing* como del transporte hacia el citoplasma, la biogénesis de microARNs, y finalmente, su participación en la formación de los gránulos de estrés (GS) (Robberecht and Philips, 2013). Estos gránulos de estrés contienen proteínas y ARNm y su función consiste en bloquear la maquinaria de síntesis de proteínas en condiciones de estrés. El dominio rico en glicina de TDP-43 es necesario para que se produzca la acumulación de esta proteína en los gránulos de estrés con propiedades prionoides (McAlary *et al.*, 2019). Los gránulos de estrés (GS) constituyen en sí mismo un ambiente pro-agregante (Robberecht and Philips, 2013). Teniendo en cuenta que estos gránulos

aparecen por el estrés celular, dicho estrés puede generar un círculo vicioso que si no se resuelve (**figura 4**), puede generar acúmulos de TDP-43 junto con las proteínas TIA1 (*T-cell intracelular antigen 1*), nucleosina (TIAR) y eIF3 (*eukaryotic translation initiation factor 3 subunit*) (Liu-Yesucevitz *et al.*, 2010). Además, TIA1 juega un papel muy importante en la patogénesis de los GS, tanto en cuanto la variable genotípica TIA1 (p.N357S) se expresa simultáneamente con la mutación de la proteína autofágica, SQSTM1(A390X), produciéndose, en mioblastos humanos, un efecto sinérgico que conduce a un defecto en el aclaramiento de estos GS y a una miotoxicidad. (Lee *et al.*, 2018). En estas condiciones, TDP-43 migra del núcleo al citoplasma y se une a proteínas tipo chaperona 14-3-3 (Umahara *et al.*, 2016), conduciendo a la activación de los factores de transcripción FoxO en el núcleo y con ellos los genes de respuesta al estrés (Salih and Brunet, 2008; Zhang *et al.*, 2014).

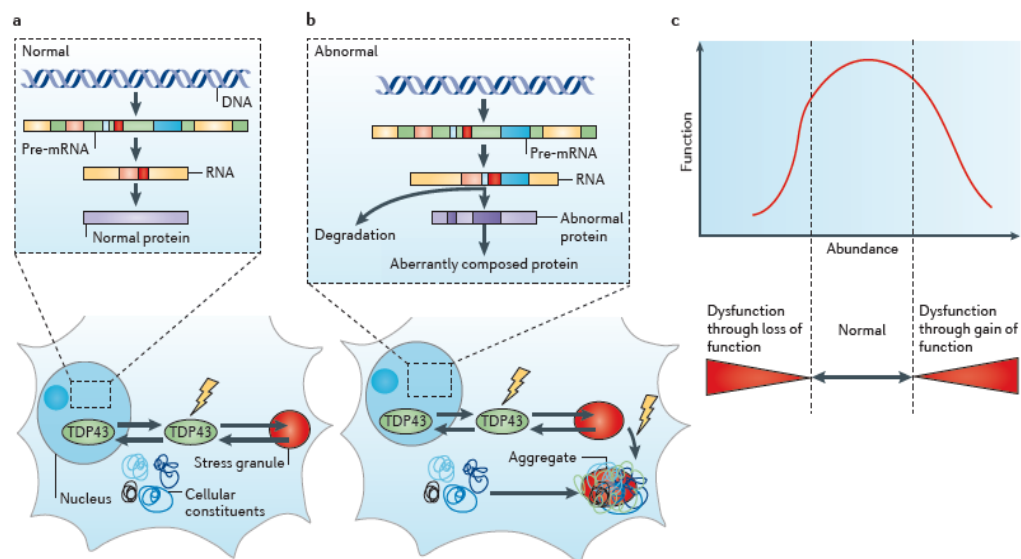


Figura 4. Posible mecanismo patogénico de TDP-43. a) Función normal de la proteína TDP-43. TDP-43, junto con otros factores, es esencial para el procesamiento normal del ARN en el núcleo. En una situación de estrés (representado por el símbolo del rayo), abandona el núcleo y se acumula en los gránulos de estrés. Si el estrés se resuelve, TDP-43 se libera de estos gránulos y vuelve a entrar en el núcleo. b) Las mutaciones favorecen que TDP-43 deje el núcleo y se acumule irreversiblemente en gránulos de estrés; factores de estrés adicionales pueden determinar esta irreversibilidad. Como resultado, el splicing de los ARNm falla. Los ARN se degradan (resultando en la ausencia de ciertas proteínas) o los ARN empalmados erróneamente dan lugar a proteínas que contienen secuencias aberrantes. c) La cantidad de proteína TDP-43 en la célula está fuertemente regulada; leves trastornos en una u otra dirección pueden inducir disfunción celular. Tomada de Robberecht and Philips, 2013.

Además, TDP-43 tiene una gran importancia en muchas funciones celulares (**figura 5**), tanto durante el desarrollo embrionario como en el adulto, lo que se puede comprobar por la letalidad de los modelos homocigotos *Knock-out* pre y post-natal (Shan *et al.*, 2010; Zufiría *et al.*, 2016).

Los agregados insolubles ubiquitinados y fosforilados de TDP-43 en el citoplasma de las neuronas motoras y de la glía, entre otras, son la marca histológica característica de la enfermedad. Hasta ahora no se ha establecido exactamente si la patología TDP-43 es debida a una pérdida de función o una ganancia de la misma.

En modelos de *Drosophila melanogaster* deficientes de *TBPH* (ortólogo de *TARDBP* o TDP-43), la mayoría de moscas mueren cuando están en estadio de crisálida que es el estadio en el que ocurre la metamorfosis de larva a adulto. Sin embargo, las supervivientes presentan disfunción y pérdida de las neuronas motoras, que se rescata al expresar TDP-43 humana. Este rescate de la degeneración de MN falla en los modelos con las mutaciones M337V o A315T (Feiguin *et al.*, 2009; Kabashi *et al.*, 2010; Voigt *et al.*, 2010). Así como en el caso de SOD1, la toxicidad de los agregados y la pérdida de localización de TDP-43 en el núcleo conducen a pensar que esta deslocalización genera repercusiones por la pérdida de actividad nuclear de TDP-43 a la vez que la ganancia de la función tóxica de los agregados. Estos agregados están presentes tanto en formas esporádicas sin mutación en el gen *TARDBP* como en las formas familiares de mutaciones en TDP-43, las cuales constituyen un 3% de las formas mendelianas (Kabashi *et al.*, 2008; Sreedharan *et al.*, 2008; Al-Chalabi *et al.*, 2012). Es importante recalcar que TDP-43 está presente tanto en los casos de ELA como en casos del complejo ELA-Demencia frontotemporal (DFT), aunque en ésta aparecen agregados similares pero en localizaciones diferentes (en las neuronas corticales de la región frontotemporal del cerebro). Esto justifica el fenotipo cognitivo-conductual. Este complejo se manifiesta también como fenotipo de las mutaciones del gen *C9ORF72*, que conlleva también la presencia de

agregados de TDP-43 aunque aún no se conoce en detalle la relación molecular entre ambos genes (Freibaum *et al.*, 2015).

✚ **FUS (*Fused in Sarcoma*)**. Después del descubrimiento de TDP-43 como componente de los acúmulos ubiquitinados presentes en las neuronas motoras, se describió otra proteína de unión al ARN/ADN con funciones similares a TDP-43, implicada igualmente en la ELA y en el complejo ELA-DFT; la proteína FUS. Localizada en el cromosoma 16, consta de 526 aminoácidos y pertenece a la familia de proteínas FET/TET (Åman *et al.*, 1996). Mutaciones en FUS producen un cuadro de ELA familiar transmitida con una herencia autosómica dominante con presencia de inclusiones citoplasmáticas de esta proteína en el cerebro y en la médula espinal (Kwiatkowski *et al.*, 2009). Algunas de estas mutaciones están asociadas a fenotipos agresivos de ELA, los cuales aparecen en la primera o segunda década de la vida con una supervivencia no mayor a 2 años (Waibel *et al.*, 2010).

FUS contiene también un dominio rico en glicinas de tipo prion que favorece la formación de agregados (Sun *et al.*, 2011). Asimismo, FUS también se encuentra formando parte de los gránulos de estrés que pueden degenerar a inclusiones citoplasmáticas (Bosco *et al.*, 2010), aunque no colocalizan con la proteína TDP-43 (Lagier-Tourenne *et al.*, 2012). Ambas proteínas están envueltas en el procesamiento de múltiples ARNs e interaccionan físicamente para regular estos procesos (Honda *et al.*, 2014). De hecho, el fenotipo de modelos *knockdown* en pez cebra de TDP-43, se rescata con la sobreexpresión de la proteína FUS (Kabashi *et al.*, 2011). Por otra parte, en *Drosophila melanogaster* se ha visto que la actividad de FUS está regulada por TDP-43 y que al silenciar ambas proteínas por separado, existen similitudes en el perfil transcriptómico, lo que sugiere una colaboración estrecha entre ambas proteínas (Wang *et al.*, 2011).

✚ **C9ORF72 (Chromosome 9 open reading frame 72)**. En 1991, se describió una familia multigeneracional con historia de ELA, DFT y ELA-DFT, cuyo gen se localizó en el cromosoma 9 (Hosler *et al.*, 2000; Kwiatkowski *et al.*, 2009; Renton *et al.*, 2011; Dols-Icardo *et al.*, 2014). En 2011 se descubrió que estas familias presentaban una mutación que consistía en una expansión del hexanucleótido (GGGGCC) en una zona intrónica del gen (Gunnarsson, Dahlbom and Strandman, 1991). Esta expansión en C9ORF72 es la causa predominante de ELA familiar aunque con grandes variaciones en su prevalencia según poblaciones (van Blitterswijk *et al.*, 2013; van der Zee *et al.*, 2013; Dols-Icardo *et al.*, 2014; Gijssels *et al.*, 2016; Ng and Tan, 2017; Tosolini and Sleight, 2017; Kaivola *et al.*, 2019). Las expansiones del hexanucleótido promueve la deslocalización de TDP-43 en el citoplasma y la traducción de dipéptidos del tipo glicina-alanina, glicina-prolina, glicina-arginina y prolina-arginina. Estos dipéptidos forman agregados citoplasmáticos con inclusiones de p62 y TDP-43 que se pueden unir también al nucleolo, dificultando la síntesis del ARN. Además, inhiben la actividad del proteasoma y producen estrés del retículo endoplásmico causando la neurodegeneración (Kwon *et al.*, 2014; Mizielinska and Isaacs, 2014; Yamakawa *et al.*, 2015). Es importante resaltar que no existe una asociación clara entre el número de repeticiones del hexanucleótido, GGGGCC, y la gravedad clínica. Por el contrario, sí existe una asociación entre tamaños intermedios del hexanucleótido, no claramente patológicos, y el riesgo de padecer la enfermedad (van Blitterswijk *et al.*, 2013). De hecho, en un primer momento se asoció la pérdida de función de C9ORF72 con la deficiencia en el transporte vesicular, la endocitosis o la autofagia (Farg *et al.*, 2014). Sin embargo, varios estudios en modelos de ratón deficientes en C9orf72, no observaban degeneración de MNs ni síntomas motores (Wen *et al.*, 2014; Koppers *et al.*, 2015a). Por otra parte, la expresión de la expansión del hexanucleótido en los cerebros de los ratones, arroja resultados contradictorios; mientras en algún estudio causaron la patología TDP-43 con inclusiones dipeptídicas, pérdida de

MNs y alteraciones conductuales (Chew *et al.*, 2015), en otros, no se replican estos resultados (Hukema *et al.*, 2014). Es necesario profundizar en el estudio de la implicación de C9ORF72 en las funciones celulares y su relación con la proteína TDP-43.

1.4.1.1.2. Otros genes asociados a formas mendelianas.

Además de estos cuatro genes mendelianos principales, a lo largo de los años se han descrito un gran número de genes que causan formas mendelianas aunque mucho menos frecuentes. Entre ellos, podemos destacar: *OPTN* (*optoneurin*) (Maruyama *et al.*, 2010), *VCP* (*valosin-containing protein*) (Johnson *et al.*, 2010), *SQSTM1* (codifica para p62) (Laurin *et al.*, 2002), *VAPB* (Nishimura *et al.*, 2004), *UBQLN2* (Deng *et al.*, 2011), *ATXN2* (Elden *et al.*, 2010), *NEFH* (Al-Chalabi *et al.*, 1999), *SIGMAR1* (Al-Saif, Al-Mohanna and Bohlega, 2011), *MATR3* (Johnson *et al.*, 2014), *TBK1* (Cirulli *et al.*, 2015), *TUBA4A*, *HNRNPA1* y *HNRNPA2B1* (Kim *et al.*, 2013). Todos estos genes participan en una gran diversidad de funciones celulares como se representan en la **figura 5**: autofagia, transporte vesicular, procesamiento del ADN/ARN, estrés oxidativo, apoptosis, integridad mitocondrial, organización del citoesqueleto, metabolismo de la glucosa y metabolismo lipídico (Zufiría *et al.*, 2016).

1.4.1.1.3. Susceptibilidad genética para el desarrollo de la ELA

Asimismo, existen otros genes causativos que presentan polimorfismos genéticos que confieren una mayor o menor susceptibilidad para padecer la enfermedad. Estos genes susceptibles han sido identificados por diferentes estudios de tipo GWAS (*Genome-wide association study*), estudio de asociación del genoma completo, en los que se estudian todos los genes con asociación o no a las diferentes enfermedades. Algunos están implicados también en formas mendelianas de la enfermedad. Por ejemplo, uno de estos genes es el que codifica la proteína ataxina 2 asociada a la ataxia espinocerebelosa que participa en el metabolismo del ARN. En un 27% de casos de ELA se han encontrado agregados citoplasmáticos de esta

proteína (Elden *et al.*, 2010). Otros genes implicados en funciones relacionados con el metabolismo de los metales se han identificado como genes de susceptibilidad para la ELA, como los polimorfismos en el gen *HFE* (Goodall *et al.*, 2005; Sutedja *et al.*, 2007). Otros genes de este grupo como *UNC13A*, que participan en funciones metabólicas tales como la secreción de insulina, tienen un valor pronóstico (van Es *et al.*, 2009). Otros genes de susceptibilidad como *EPHA4*, *CYP27A1*, *ZNF512B* y *CX3CR1*, entre otros, participan en otras funciones celulares relacionadas con el metabolismo del

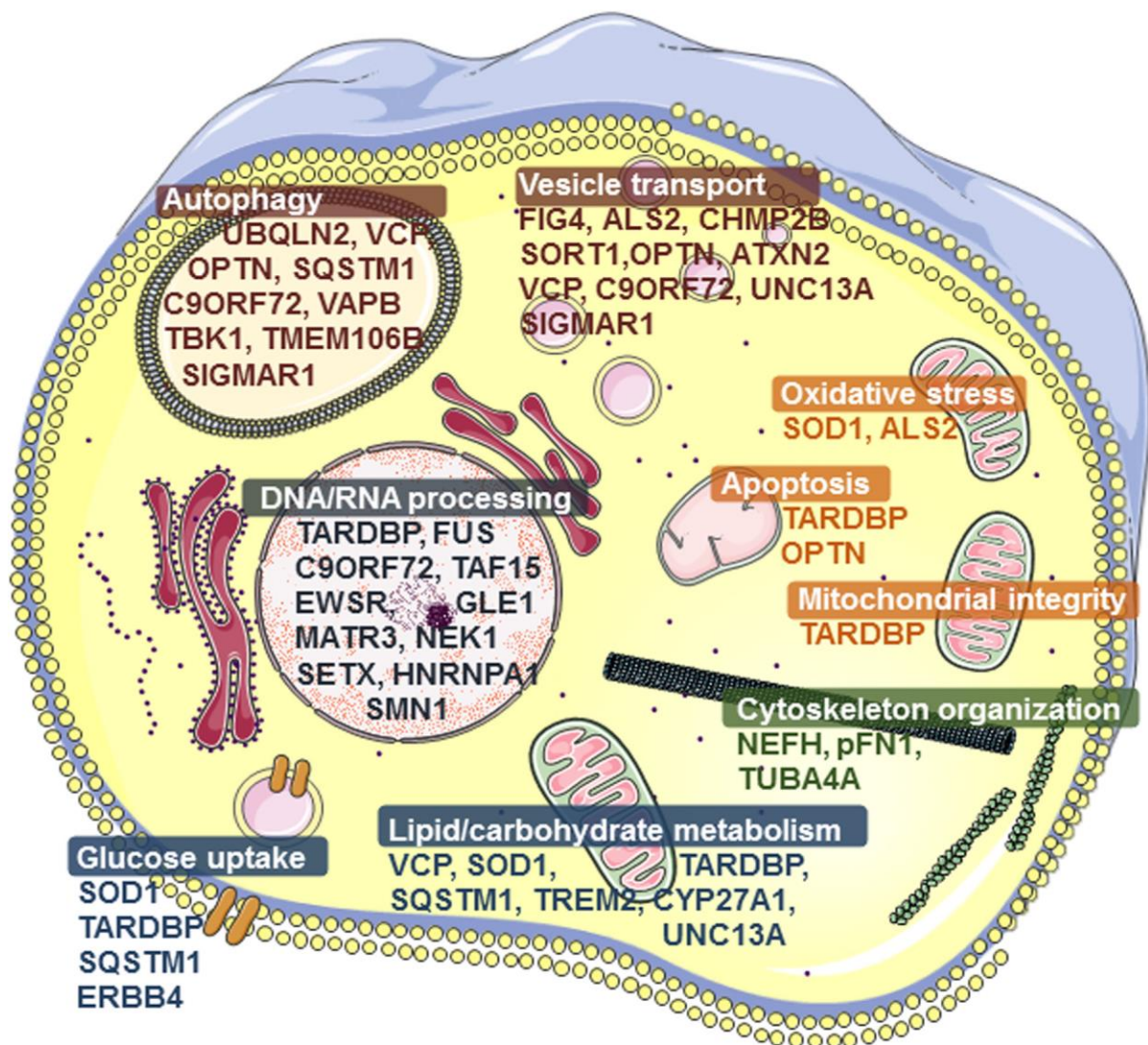


Figura 5. Principales funciones celulares en las que están implicados los genes causantes o de susceptibilidad de la ELA. La mayoría de las proteínas codificadas por los genes causales y de susceptibilidad de la ELA son participantes de tres funciones celulares principales: procesamiento de ADN / ARN, autofagia y transporte vesicular. Varios genes también están implicados en vías que regulan el metabolismo energético y en la dinámica del citoesqueleto. La apoptosis, la eliminación del estrés oxidativo y la integridad mitocondrial también son funciones celulares comunes en las que los genes de la ELA desempeñan funciones importantes. Tomada de Zufiría *et al.*, 2016.

colesterol, desarrollo neuromuscular, respuesta inmune, sinapsis, etc. (Diekstra *et al.*, 2012; Tetsuka *et al.*, 2013; Uyan *et al.*, 2013).

Existe controversia entre la afirmación de que las mutaciones en *TARDBP*, *SOD1* y *FUS* sean o no pérdida de función de dichos genes. Si bien es cierto que el término ganancia de función se refiere en realidad, a ganancia de función tóxica generada por la sobreexpresión y agregación de dichas proteínas mal plegadas y no a la ganancia de función esencial de éstas (Sau *et al.*, 2007; Lee, Lee and Trojanowski, 2011a; Armstrong and Drapeau, 2013; Sun *et al.*, 2015; Şxahin *et al.*, 2017; Baskoylu *et al.*, 2018; An *et al.*, 2019). El acuerdo más extendido es que el carácter dominante derivado de esta ganancia de función deriva tanto de la pérdida de la función esencial de la proteína como de la emergencia de una función tóxica. Las mutaciones en la región 3'UTR de *TARDBP* y *FUS*, región autorreguladora, generan una sobreexpresión de ambas proteínas con ganancia de función tóxica debido a la formación de agregados citoplasmáticos y pérdida de función nuclear. Otras mutaciones de *TARDBP* y *FUS* en otros lugares de la estructura genómica producen la pérdida de función como proteínas procesadoras de RNA, producen la desregulación de sus genes diana, lo que genera un estrés celular de tipo oxidativo, metabólico y proteostático secundario. Para esclarecer la disyuntiva de si la pérdida o ganancia de función tóxica son los elementos precipitantes de la patología, se ha investigado por separado e independientemente la contribución de ambos factores: la ganancia de función tóxica por un lado y la pérdida de función por otro, concluyendo que ambas situaciones contribuyen de forma muy similar en la citotoxicidad (Cascella *et al.*, 2016).

1.4.2. Visión multidimensional: teoría multipaso

Dado que los genes implicados en la génesis de la ELA están implicados en prácticamente todas las funciones celulares, en los últimos años se ha abierto, dentro de las teorías de causalidad de la enfermedad, la teoría de los pasos múltiples. Dicha teoría propugna que la patogenia de la

enfermedad no se debe a un único evento patogénico sino a una sucesión de pasos que pueden ser diferentes en su naturaleza y orden, que de acuerdo a las teorías de causalidad de Rothman (Rothman and Greenland, 2005), conducirían a la muerte de la motoneurona. Como derivada de esta visión multidimensional, la investigación en la patogenia de la ELA debería abordar de manera simultánea el esclarecimiento (cronológico y jerárquico) de estos pasos para comprender lo que está sucediendo. Dado que la ELA aparece generalmente en edades comprendidas entre los 50 y 70 años de forma progresiva y bastante fulminante (Al-Chalabi and Lewis, 2011; Byrne *et al.*, 2013), ese proceso podría ser la resultante de varios eventos anteriores que asociados al envejecimiento y a otros factores ambientales que conducen a la enfermedad (Riancho *et al.*, 2019). La pleiotropía de expresión clínica de este proceso puede, en algunos casos, conducir a partir de mutaciones en un mismo gen a cuadros neurodegenerativos o miopáticos diferentes, en dependencia de polimorfismos en otros genes (Lee *et al.*, 2018). Del mismo modo, la gravedad de los síntomas, la progresión de la enfermedad y las regiones neuronales de inicio de la degeneración no son específicas de una mutación concreta ni tampoco se asocian a un factor de riesgo específico (Ravits and La Spada, 2009).

En 2014, Al-Chalabi y colaboradores modelizaron esta complejidad mediante un algoritmo matemático construido a partir de las tasas de prevalencia detectadas en diversos estudios epidemiológicos ajustadas por edad, concluyendo que la enfermedad se produciría como consecuencia de un proceso con cinco etapas (Al-Chalabi *et al.*, 2014).

Dentro de este modelo multidimensional, el reto es identificar la naturaleza de esos pasos, ordenarlos jerárquica y temporalmente, identificar cuáles son contingentes o imprescindibles en todo escenario. Dentro de esa búsqueda y teniendo en cuenta algunas de las evidencias epidemiológicas, se ha ido abriendo paso en los últimos años una visión de la ELA como enfermedad primariamente metabólica muscular que será el objeto fundamental de este trabajo.

1.4.3. La ELA como enfermedad metabólica

1.4.3.1. La regulación del metabolismo

Los organismos pluricelulares tienen funciones específicas y por ello cada tejido tiene necesidades energéticas especiales. La homeostasis energética de cada tejido es el resultado de un gran número de procesos metabólicos que son regulados por mecanismos que mantienen en equilibrio la producción y el consumo de energía. Cuando estos mecanismos fallan se produce un desbalance energético en el que puede aparecer dos situaciones: una situación de hipometabolismo con un descenso de las necesidades energéticas, ya sea por una ralentización del metabolismo como ocurre, por ejemplo, en el hipotiroidismo, o porque el gasto energético sea menor como sucede en los estilos de vida sedentarios; y otra situación alternativa con una aceleración del metabolismo que puede ocurrir en escenarios con alta necesidad energética insatisfecha, bien por fallo primario en la producción, como ocurre en las enfermedades mitocondriales o en la diabetes tipo I, o bien por un exceso de demanda como aparece tras un ejercicio físico intenso y extenuante. En ambas situaciones el organismo tiene recursos tanto hormonales como nerviosos para poner en marcha la adaptación metabólica. El sistema neuroendocrino, constituido por el eje hipotálamo-hipófisis, secreta hormonas implicadas en la integración del metabolismo. Estas hormonas son la adrenalina, el glucagón y la insulina que coordinan el metabolismo energético en el músculo, hígado y tejido adiposo.

Cuando bajan los niveles de disponibilidad de energía en el organismo, ya sea en forma de descenso de disponibilidad del combustible más rápidamente utilizable (glucosa sanguínea) o por descenso de los niveles de energía en forma de adenosín trifosfato (ATP), se produce un estrés energético global. Este estrés activa el eje hipotálamo-hipófisis liberando a la sangre las hormonas adrenocorticotropa (ACTH) por la hipófisis, la noradrenalina y adrenalina por la médula suprarrenal, y el cortisol por la corteza suprarrenal, que junto la liberación del glucagón por el páncreas,

van a actuar de manera sinérgica en los principales tejidos de la siguiente manera:

- ✓ Glucagón: actúa en el hígado con el objetivo principal de liberar glucosa en la sangre de tal manera que se mantengan las necesidades del cerebro. Para ello, se activan la glucogenolisis y la gluconeogénesis.
- ✓ Adrenalina/Noradrenalina: actúan en el tejido adiposo, en el hígado y en el músculo. En el hígado actúan como el glucagón. En el músculo, se activan las vías de obtención de energía. En el tejido adiposo se produce la movilización de las grasas y activación de la lipólisis con la liberación de ácidos grasos a sangre. Al Aumentar los ácidos grasos en sangre se activa la entrada de éstos en el músculo esquelético. Una vez allí, entran en la mitocondria y por la β -oxidación se transforman en acetil-CoA, sustrato del ciclo de Krebs para la obtención de ATP a través de las coenzimas reductores NADH y FADH₂ en la fosforilación oxidativa.
- ✓ Cortisol: Actúa activando la gluconeogénesis hepática y la degradación de proteínas musculares, en el músculo esquelético.

Cuando en un organismo esta adaptación metabólica no resuelve esta situación de estrés, se induce un estado hipercatabólico para tratar de compensar la situación (**figura 6**).

Se define el hipercatabolismo como: la activación exacerbada de las vías de obtención de energía ya sea debido a un exceso en el gasto energético o a una alteración en los mecanismos involucrados en la síntesis de ATP. Esto implica una necesidad de energía constante no satisfecha y la degradación excesiva de combustibles metabólicos, pudiendo generar múltiples efectos nocivos en el organismo. Esta activación exacerbada conlleva una lipólisis exagerada con pérdida de grasa y una desviación del oxalacetato mitocondrial hacia la gluconeogénesis para obtener glucosa en el hígado. El oxalacetato es un metabolito necesario para transformar el acetil-CoA en citrato en el ciclo de Krebs. Por lo tanto, en esta situación, al desviar el oxalacetato para otro fin, el acetil-CoA se va a acumular en la mitocondria, lo que conlleva a un bloqueo en la β -oxidación y con ello, el bloqueo de la entrada de los ácidos grasos a las mitocondrias,

acumulándose en las células y con ello, aumentando los niveles de éstos en sangre. Este aumento de ácidos grasos puede dar lugar a su depósito en el hígado (esteatosis hepática). La acumulación de acetil-CoA activa también la síntesis de cuerpos cetónicos produciendo una situación de cetoacidosis hepática. Un aspecto fundamental de esta adaptación, es la desviación del oxalacetato para la gluconeogénesis. Para mantener esta desviación, el cortisol liberado por la corteza adrenal, activa la degradación de proteínas musculares y los aminoácidos producto de la misma, se transforman, por reacciones de transaminación, en esqueletos carbonados del ciclo y así en oxalacetato, con el consiguiente aumento de amonio tóxico en sangre, induciendo así una atrofia muscular secundaria al incremento del catabolismo muscular (Lehninger, 1993). Esta secuencia de adaptación metabólica se produce en diversos escenarios patológicos como en la diabetes tipo 1 mal controlada, en estados carenciales nutricionales como el ayuno (McGarry and Foster, 1980; Robinson and Williamson, 1980; Foster and McGarry, 1983), y se ha observado también en pacientes con ELA (Parekh, 2015).

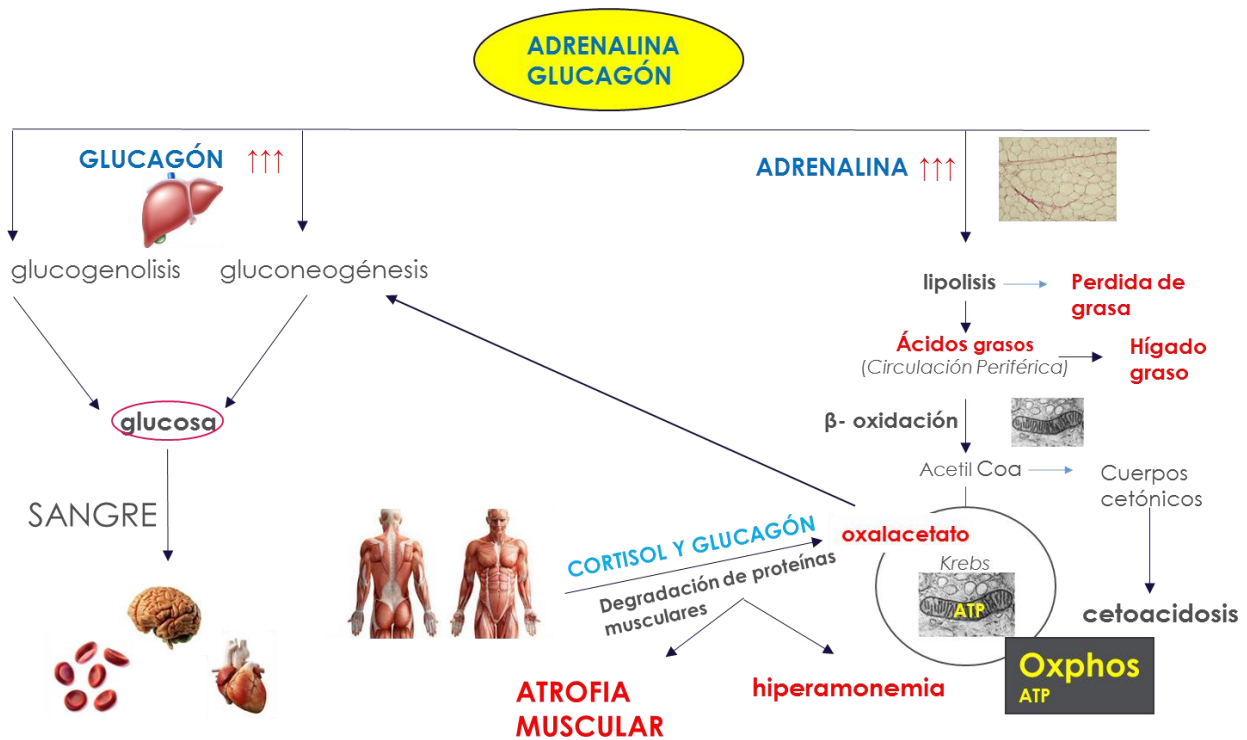


Figura 6. El estado hipercatabólico. La adaptación del organismo en estados deficientes de energía.

1.4.3.2. Evidencias clínicas de un estado hipercatabólico en la ELA

En efecto, en base a datos experimentales dispersos pero bastante congruentes, se viene barajando desde hace años con la posibilidad de que los pacientes con ELA presenten una disfunción metabólica y que esa disfunción influya negativamente en la progresión de la enfermedad (Van den Bergh *et al.*, 1977). En estos estudios, se demostró la existencia de una alteración en el metabolismo de la glucosa, aunque localizan esta deficiencia en diferentes puntos; ya sea, la secreción de insulina por el páncreas, o el metabolismo de la glucosa dependiente de la acción de la insulina debida a una resistencia a su señalización y, como consecuencia, una alteración en el metabolismo de los carbohidratos. En algunos de estos trabajos se había postulado la disfunción endocrina pancreática primaria como responsable del metabolismo anormal de la glucosa (Barris, 1953b, 1953a; Quick and Greer, 1967; Mueller and Quick, 1970; Gotoh *et al.*, 1972; Nagano, Tsubaki and Chase, 1979; Pradat *et al.*, 2010). Sin embargo, Collis y Engel (1968), propusieron que la intolerancia a los carbohidratos en la ELA

se debía a la atrofia muscular y a otros factores generales como la inactividad física (Collis and Engel, 1968). Otros autores afirmaron que la alteración en el metabolismo de los carbohidratos estaba fundamentada en un defecto en la síntesis y secreción de insulina debido a un daño en las células pancreáticas, y que el consumo de glucosa mayormente se producía en el hígado y no en el músculo (Saffer, Morley and Bill, 1977). Años antes, otro estudio apoyaba ya esta afirmación de que la intolerancia a la glucosa en la ELA se basaba principalmente en la secreción alterada de la insulina pancreática (Gotoh *et al.*, 1972). Posteriormente, se demostró en otro trabajo, en el que participaban también pacientes con otras enfermedades neuromusculares, que la alteración del metabolismo de los carbohidratos en la ELA, era independiente de la masa muscular, que no era debida a una disminución de los receptores de glucosa musculares y que el fallo era intrínseco del propio metabolismo (Reyes *et al.*, 1984).

Algunos de estos rasgos, como la resistencia a la insulina se dan también en estados de obesidad, pero en la ELA, al contrario que en la obesidad, las reservas energéticas están disminuidas. De hecho, mientras que la diabetes tipo 1 constituye un factor de riesgo para desarrollar la enfermedad, la diabetes de tipo 2 confiere un factor protector debido a que en esta última el aumento de las reservas energéticas protege de la progresión y tal vez de la generación de la enfermedad (Lekoubou *et al.*, 2014; Mariosa *et al.*, 2015). Por modelizar las diferencias entre una y otra condición, en la diabetes tipo 1 se da una adaptación hipercatabólica debida a una necesidad energética del músculo esquelético producida por la no entrada de glucosa mediada por la insulina en las células musculares. Esta necesidad de energía activaría la liberación de las hormonas contra-reguladoras comentadas anteriormente. Por el contrario, en la ELA esta alteración en el metabolismo de los carbohidratos podría ser secundaria a una patología propia del músculo (Reyes *et al.*, 1984). Asimismo, también se han encontrado alteraciones en la β -oxidación de los ácidos grasos y en la síntesis de cuerpos cetónicos (Sanjak *et al.*, 1987). Como se ha explicado anteriormente, el bloqueo de esta vía degradativa produce una

acumulación de ácidos grasos que pueden inducir el desarrollo de esteatosis hepática. De hecho, en una pequeña cohorte japonesa de pacientes con ELA se corroboró su presencia en el 76% de los pacientes (Nodera *et al.*, 2015).

Esta nueva visión patogénica de la ELA como enfermedad metabólica es congruente con una serie de signos y síntomas propios de la enfermedad tales como la pérdida de peso, tanto de la masa muscular magra como de la grasa subcutánea (Lim *et al.*, 2012). En base a estas observaciones, en 2001, se propuso que la ELA se podría definir como un desorden metabólico en el que los pacientes presentaban un estado hipercatabólico primario evidenciado por técnicas calorimétricas, con pérdida de masa grasa, no asociada a otros factores de confusión como las dificultades de ingesta nutricional, la reducción de la función respiratoria, un hipertiroidismo latente o una infección, ni tampoco derivado de la actividad muscular producida por las fasciculaciones y/o la espasticidad intensas (Desport *et al.*, 2001; Funalot *et al.*, 2009; Dupuis *et al.*, 2011a). Otros estudios han completado esta visión al detectar otras manifestaciones propias de este estado hipercatabólico como los niveles séricos elevados de glucagón, de aminoácidos y de amonio directamente en relación con la progresión de la ELA (Patten, Kurlander and Evans, 1982; Parekh, 2015). Es muy relevante el hecho de que este estado hipercatabólico no parece secundario a las consecuencias de las manifestaciones clínicas de la enfermedad (atrofia muscular por denervación, desnutrición, etc.) lo que, sugiere que este componente metabólico puede ser un componente primario en la patogenia de la ELA.

1.4.3.3. TDP-43 y otros genes asociados a la ELA son reguladores del metabolismo

Un hecho que viene a reforzar este posible papel estelar del metabolismo energético en la patogenia de la ELA deriva del hecho de que algunos de los principales genes implicados en las formas familiares de la ELA, como

TARDBP que codifica a TDP-43, la proteína mayoritariamente depositada en las neuronas, participan en el metabolismo de los azúcares y lípidos. En algunos modelos animales se ha visto que la pérdida total de TDP-43 es letal en la fase de implantación pre-embionaria y que la depleción heterocigota producía déficits motores sin degeneración de motoneuronas (Kraemer *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2010). La explicación de este hecho se asocia a la relación de la patología con la edad y las alteraciones metabólicas del envejecimiento, pues eran los ratones adultos y no los jóvenes, los que presentaban debilidad muscular. En otros modelos, en los que se ha producido una depleción postnatal total de esta proteína, se produce una pérdida dramática de peso y grasa seguida de una muerte rápida. Por otro lado, la sobreexpresión de la proteína normal con la mutación A315T en el SNC resulta en un aumento de peso, de grasa y de una resistencia a la insulina derivada de la obesidad en modelos animales (Stallings *et al.*, 2013). Sin embargo, cuando esta misma mutación se expresa en todos los tejidos se produce una pérdida de masa grasa en un 10%, con alteraciones en el metabolismo de los ácidos grasos y una disfunción mitocondrial (Stribl *et al.*, 2014).

Todavía se desconocen los mecanismos por los que TDP-43 regula el metabolismo, pero estudios recientes asocian a TDP-43 con el sensor energético celular AMPK a través del cual se activaría la entrada de glucosa en la célula muscular cuando bajan los niveles celulares de ATP/AMP. Para apoyar este mecanismo de sensor, se ha visto que los ratones portadores de la mutación A315T presentan una actividad menor de la AMPK en la MN (Perera, Turner and Turner, 2015). Esto es de vital importancia para la supervivencia neuronal ya que la AMPK estimula la glucólisis. Siendo en las neuronas el metabolismo de la glucosa dependiente principalmente de la entrada del lactato, producto de la glucólisis liberado de los astrocitos a la MN (Bé Langer, Allaman and Magistretti, 2011). De acuerdo a la hipótesis metabólica, la glucólisis en el astrocito estaría también regulada por TDP-43. Otro estudio reciente realizado en los islotes pancreáticos obtenidos de autopsias de pacientes con ELA, relaciona la intolerancia a la glucosa

observada en los pacientes con una disminución en la liberación de insulina ocasionada por la pérdida nuclear de TDP-43. En ese mismo estudio demostraron que la pérdida de localización nuclear de TDP-43 en células β de ratones, disminuía la secreción de insulina en dichas células. Este efecto se producía por la disminución de expresión de canales de calcio de tipo L-voltaje dependientes, responsables de la exocitosis de vesículas cargadas de insulina y se vio que el efecto revertía con la sobreexpresión de dichos canales (Araki *et al.*, 2019). Según estos datos, con la pérdida de función de TDP-43 la expresión de los canales de calcio responsables de la secreción de insulina disminuye, explicando así todos los resultados de los estudios antiguos citados anteriormente, en los que ya se apuntaba a la existencia de un problema pancreático de las células secretoras de insulina en la ELA. En cuanto a otro gen relacionado con las formas familiares de la ELA, *SOD1*, se ha visto que participa en la regulación del metabolismo de la glucosa y de los lípidos en ratones *knock-out* o mutantes. En un estudio demuestran que la ausencia de *SOD1* produce una disminución de las reservas de glucógeno y de la producción de glucosa en el hígado además de un aumento en el perfil lipídico en ratones adultos (Wang, Jiang and Lei, 2012b). La mutación G93A de *SOD1* también produce un aumento de glucagón en sangre y disminuye la disponibilidad de grasa en ratones (Dodge *et al.*, 2013). Asimismo, el ratón *SOD1*^(G93A) presenta un déficit en la entrada de glucosa mediada por la insulina en el músculo esquelético, pérdida de masa grasa y alteraciones en el metabolismo lipídico (Fergani *et al.*, 2011; Smittkamp *et al.*, 2013). En estudios realizados por Zhao y colaboradores en 2006 y 2012, demostraron que el tratamiento antidiabético mejoraba la clínica y ralentizaba la progresión en ratones *SOD1*^(G93A) (Zhao *et al.*, 2006, 2012).

Los otros dos genes más importantes de las formas familiares, *FUS* y *C9ORF72*, también se relacionan con el metabolismo energético. Se ha visto que las células HEK293 con mutaciones en *FUS* tienen bajos niveles de ATP y los pacientes con expansión de *C9ORF72* presentan en la Tomografía por Emisión de Positrones con 18F-fluorodeoxiglucosa (PET-FDG), en los que se

observan, en regiones cerebrales diferentes, un uso disminuido de captación de glucosa (Cistaro *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015). Además de estos genes, otros genes relacionados con la ELA participan en el metabolismo de la glucosa, como son los genes *ERBB4* y *SQSTM1*. La asociación interactiva neuregulina-1/*ERBB4*, en la membrana plasmática, inicia la vía de señalización, mediada por el calcio intracelular, durante el ejercicio físico en las células musculares para la captación de glucosa (Takahashi *et al.*, 2013). Asimismo, p62/*SQSTM1* regula la señalización de insulina a través de la interacción con el sustrato 1 del receptor de insulina (*insulin receptor substrate-1*, *IRS1*). La sobreexpresión de p62 mejora la resistencia a la insulina y activa la translocación del transportador GLUT4 a la membrana plasmática mientras que la depleción de p62 empeora la señalización de la insulina (Rodríguez *et al.*, 2006; Geetha *et al.*, 2012).

En resumen, existe un conjunto de evidencias clínicas y experimentales que soportan una nueva visión de la ELA como enfermedad del metabolismo, si bien la conexión de estas alteraciones con la degeneración de la motoneurona no está aún establecida. Teniendo en cuenta que el músculo esquelético es un tejido central en la regulación global del metabolismo, cobra valor su estudio en el contexto de la ELA más allá de su papel clásico como el tejido en el que se manifiestan las consecuencias de la denervación.

En ese sentido, resulta de interés analizar cual es el impacto de las mutaciones causativas de ELA en este tejido usando modelos animales y celulares que eviten el solapamiento molecular con la denervación que existe en los pacientes con ELA. Este análisis debería incluir tanto el metabolismo energético y maduración de las células musculares, como la señalización de la insulina.

1.5. Características clínicas de la ELA

Los síntomas clínicos no son similares en todos los pacientes ya que en unos predominan los signos de afectación motoneurona superior (MNS), en otros

los de la inferior y en algunos, el deterioro predominantemente es de las motoneuronas troncoencefálicas (bulbares), hasta que en el curso clínico la afectación sea global. La sintomatología varía dependiendo del nivel anatómico afectado.

Son signos de afectación de la motoneurona superior el incremento del tono muscular, la espasticidad y la hiperreflexia, con clonus aquileo y reflejos de liberación anómalos, como el signo de Babinski o de Hoffmann. Este piramidalismo produce torpeza del movimiento y debilidad muscular leve por descontrol del tono muscular. El síndrome piramidal es simétrico y generalizado, aunque puede predominar en miembros inferiores. El habla se vuelve espástica o bulbar por afectación de la primera y la segunda motoneurona y aparece disfagia para ingerir líquidos que en estadios avanzados es también para los sólidos. Los reflejos de liberación como el mentoniano están exaltados y existe labilidad emocional (risa o llanto incontrolado) de tipo pseudobulbar, pudiéndose asociar un deterioro cognitivo frontotemporal con alteraciones conductuales en algunos casos, sobre todo los ligados a algunas formas familiares de ELA-DFT.

Son signos de afectación de motoneurona inferior (MNI) la debilidad muscular intensa y la amiotrofia progresiva en los músculos de las regiones medulares afectadas. La sintomatología puede ser inicialmente focal (bulbar o distal en una extremidad) y asimétrica, para luego extenderse globalmente. También aparecen fasciculaciones y calambres musculares, antes incluso de que la debilidad muscular sea evidente. En la musculatura de inervación bulbar se produce atrofia y fasciculaciones en la lengua, con debilidad progresiva de los músculos faríngeos y de la musculatura masticatoria, lo que provoca una disfagia progresiva que incapacita al paciente incluso para tragar saliva, y una disartria que evoluciona hasta una anartria completa que imposibilita la comunicación verbal del enfermo.

En general, los núcleos oculomotores y de Onuf, del control esfinteriano, están respetados, aunque se han detectado alteraciones subclínicas en algunos de ellos (Gutiérrez-Rivas, 2017).

La aparición de niveles sensitivos, síndromes disautonómicos o extrapiramidales, presentes en menos del 5% de los enfermos, pueden hacer dudar del diagnóstico y obligan a descartar otros procesos sobre todo neuropatías motoras de origen autoinmune (Oldstone *et al.*, 1976; Ralli *et al.*, 2019). El deterioro cognitivo está presente en el complejo Demencia-ELA, y se pueden observar rasgos de disfunción frontotemporal hasta en el 50% de los enfermos aunque sólo un 10-15% cumplen los criterios diagnósticos de DFT (Ringholz *et al.*, 2005).

1.5.1. Variantes clínicas

Atrofia muscular progresiva

Representa un 5-10% de los casos. Se trata de un síndrome de motoneurona inferior progresiva sin signos de motoneurona superior durante, al menos, los tres primeros años. Comienza hacia los 40 años. Más del 50 % de los casos presentarán más adelante signos de motoneurona superior, y la mayoría desarrollará una ELA. Formas de esta variante son la diplejía amiotrófica progresiva o síndrome del hombre en barril (*frail syndrome*), donde se afecta la musculatura proximal de las extremidades superiores, bilateralmente, para extenderse al resto de los brazos, respetando las extremidades inferiores, y la forma pseudopolineurítica de Patrikios, que puede confundirse con radiculopatías o neuropatía motora (Yedavalli, Patil and Shah, 2018).

Esclerosis lateral primaria

Es una forma rara cuando es pura (1%). Se trata de un síndrome de motoneurona superior puro sin afectación de motoneurona inferior, durante, al menos, los cuatro primeros años de enfermedad. Comienza entre los 45-55 años, habitualmente en los miembros inferiores. Tiene un curso clínico largo (20 años de media). Exige realizar el diagnóstico diferencial con la paraparesia espástica, lo que es muy difícil al comienzo si no se objetivan signos clínicos o electromiográficos de lesión de motoneurona inferior, y con

otras mielopatías progresivas de origen infeccioso o inflamatorio, por el virus HTLV (*human t-lymphotropic virus 1*) y formas pregresivas de Esclerosis múltiple (Singer *et al.*, 2007).

Parálisis bulbar progresiva

Representa hasta un 15% de los casos y se presenta como una afectación inicial de la musculatura de inervación bulbar, sin signos de lesión a otros niveles. La enfermedad se extiende luego a la musculatura cervical, a la cintura escapular y los brazos, con peor pronóstico, pues pronto afecta a los núcleos espinales del diafragma. Es más habitual en edades avanzadas y es más frecuente en mujeres (Turner and Talbot, 2013).

1.5.2. Diagnóstico

El diagnóstico de la ELA es clínico y se apoya en pruebas complementarias agrupadas en forma de criterios. En 1994 se elaboraron los Criterios Diagnósticos de El Escorial en una reunión de investigadores internacionales realizada en esta localidad y fueron posteriormente revisados para incluir los hallazgos electromiográficos. Se basaron en los signos de afectación de primera y segunda motoneurona, en ausencia de otra enfermedad, y en los datos de progresión en el tiempo, estableciéndose unas categorías de posible, probable, probable apoyada por datos de laboratorio y definida (Brooks, 1994; Brooks *et al.*, 2000) **(Tablas I y II)**.

Las exploraciones complementarias que incluyen la electromiografía (EMG), la resonancia magnética nuclear (RMN) y determinadas pruebas y análisis clínicos dirigidos a descartar otras afecciones y, en indicaciones específicas, estudios del LCR y biopsias de músculo o nervio. La ausencia de marcadores biológicos y la gran variedad de presentaciones clínicas de la ELA hacen que, en ocasiones, el proceso diagnóstico sea complejo y largo, pero es muy importante asegurar el diagnóstico antes de comunicarlo al paciente y sus familiares, por las implicaciones pronósticas que conlleva.

En 2006 se desarrollaron los criterios de Awaji, en los que se equiparan los hallazgos de la electromiografía a los hallazgos de la exploración clínica, eliminando la categoría de "probable apoyada por laboratorio". Sin embargo, en la práctica clínica diaria y en ensayos clínicos internacionales, aún se siguen usando los criterios de El Escorial modificados, al no haber conseguido estos nuevos criterios suficiente adherencia.

Hasta ahora no se han descubierto marcadores biológicos establecidos, con suficiente valor, para el diagnóstico de la enfermedad. A veces se realiza un diagnóstico por exclusión cuando los datos contradicen la existencia de cualquier otra enfermedad dentro del diagnóstico diferencial:

Presencia de:
✓ Signos de degeneración de MN inferior, por exploraciones clínicas, electrofisiológicas o neuropatológicas.
✓ Signos de degeneración de MN superior por exploración clínica.
✓ Progresión de signos de una región a otras por historia o exploración clínica.
Ausencia de:
✓ Evidencia electrofisiológica o anatomopatológica de otro proceso que pudiera explicar los signos de degeneración de primera y segunda MN, o ambas.
✓ Evidencia por neuroimagen de otro proceso que pudiera explicar los signos.

Tabla I. Criterios de El Escorial. Modificada de Brooks, 1994.

ELA definitiva	Signos de MNS y MNI en tres regiones.
ELA probable	Signos de MNS y MNI en dos regiones, con algunos signos de MNS rostrales a los signos de MNI.
ELA probable apoyada por laboratorio	Signos de MNS y MNI en una región o solo signos de MNS en una región con signos de MNI en la EMG en dos o más extremidades.
ELA posible	Signos de MNS y MNI en una región o solo signos de MNS en dos o más regiones, o signos de MNI rostrales a signos de MNS.

Tabla II. Criterios de El Escorial. Niveles de certeza clínica. MNS (motoneurona superior). MNI (motoneurona inferior).

Las exploraciones complementarias más importantes son las de carácter neurofisiológico como la **electromiografía** (EMG), que busca presencia de signos de denervación aguda de MNI como fasciculaciones, pérdida de unidades motoras, etc. Los signos de denervación y reinervación deben estar presentes en al menos dos músculos de tronco y raíces espinales diferentes. La EMG puede utilizarse, aunque no está indicada, para el seguimiento clínico cuantificando el número de unidades motoras mediante el método MUNIX. Este método, desarrollado por Nandedkar y colaboradores no es invasivo y se aplica con los electrodos estándar de estudios de conducción nerviosa (NCS) colocados sobre los músculos medianos o cubitales inervados de la mano (Nandedkar and Mulot, 2019). Recientemente se han realizado estudios a más largo plazo con MUNIX, con extensión de la técnica a los músculos tibial anterior y trapecio, y a etapas más tempranas de la enfermedad. El software para MUNIX está cada vez más disponible gratuitamente en las máquinas estándar de EMG *Viking* y *Synergy*.

La **estimulación magnética transcraneal** se utiliza para medir las velocidades de conducción motora desde la corteza a lo largo de la vía piramidal.

La **resonancia magnética craneal, cervical y cérvico-dorsal** (RMN) es importante para descartar las anomalías estructurales (tumores, lesiones inflamatorias, desmielinizantes y vasculares troncoencefálicas, etc.) que puedan provocar un síndrome piramidal por afectación de primera motoneurona.

Los **estudios de laboratorio** incluyen las pruebas dirigidas a descartar otras etiologías de la afectación de motoneurona (metabólica, infecciosa, autoinmune, etc.) (Dupuis *et al.*, 2011b; Palamiuc *et al.*, 2015; McCauley and Baloh, 2019; Parker *et al.*, 2019). En los casos con componente familiar, las pruebas genéticas están dirigidas a descubrir mutaciones en un gen responsable. Entre los estudios bioquímico-metabólicos se incluye la determinación de creatinquinasa (CK) sérica que refleja destrucción muscular y suele ser normal o muy discretamente aumentada en la ELA,

pues es la atrofia muscular y no la destrucción muscular, la que prevalece. En algunas ocasiones en las que la CK está francamente elevada y el EMG no es muy elocuente, es plausible que haya que realizar una biopsia muscular aunque, en general, ésta no es una prueba diagnóstica habitual en la ELA. El patrón morfológico del músculo es un patrón denervativo con agrupamiento de fibras. Hay escasos datos que sugieren un patrón inflamatorio en músculo tanto en pacientes como en el modelo murino *SOD1^(G93A)* (Gasco *et al.*, 2017; Lehmann *et al.*, 2018).

El estudio del LCR se hace fundamentalmente para descartar otros diagnósticos que pueden simular una ELA, como una paraparesia espástica por infección del virus HTLV (virus linfotrópico de células T humanas) o, en casos con evolución atípica, una patología neuroinflamatoria con afectación medular o neoplásica asociada sobre todo a pacientes menores de 40 años (Kuroda and Sugihara, 1991; Portegies and Goudsmit, 1991; Silva *et al.*, 2005).

Se han reportado diversos biomarcadores en LCR, como los neurofilamentos de cadenas pesadas y ligeras y otros cuya sensibilidad y especificidad es bastante alta pero que no se usan aún en la rutina asistencial (Al-Chalabi *et al.*, 1999; Poesen *et al.*, 2017). El uso de algunos de estos biomarcadores en LCR, suero y orina con valor diagnóstico o pronóstico, se circunscribe por ahora al ámbito de la investigación (Poesen *et al.*, 2017).

1.5.3. Diagnóstico diferencial

Las principales enfermedades que deben descartarse se muestran en la tabla siguiente:

1. Enfermedades infecciones y priónicas	5. Enfermedades inmunes
• Poliomielitis y secuelas post-poliomielitis	• Enfermedad linfoproliferativa
• Herpes zóster	• Síndrome paraneoplásico
• VIH	• Neuropatía motora multifocal
• Virus linfotróficos	6. Enfermedades degenerativas del SNC
• Priones: enfermedad de Creutzfeldt-Jacob	• Atrofia muscular espinal del adulto
2. Enfermedades metabólicas	• Atrofia bulbo espinal de Kennedy
• Enfermedades de depósito	• Atrofia monomérica
• Enfermedades endocrinas: diabetes mellitus hipertiroidismo.	• Paraplejia espástica hereditaria
3. Tóxicos	• Ataxias espinocerebelosas
• Plomo	• Atrofia multisistémica
• Mercurio y otros metales pesados	7. Síndromes de hiperactividad
• Latirismo	• Síndrome de la persona rígida
4. Origen físico	
• Mielopatía isquémica o por lesión estructural	
• Neuronopatía motora post-radiación	
• Traumática, incluyendo la electrocución	

Tabla III. Diagnóstico diferencial de la ELA.

1.5.4. Evaluación clínica

La gravedad y progresión de los síntomas y signos en la ELA se han medido de varias maneras. Actualmente, la más utilizada es la *Revised Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rating Scale (ALSFRS-R)*, que evalúa la discapacidad del paciente por áreas. Su empleo es sencillo, rápido, fácilmente entendible por los pacientes y sus cuidadores, y se puede aplicar en la clínica y en investigación.

Consta de 12 ítems con valoración semicuantitativa. De manera prototípica se ha establecido que la enfermedad progresa un punto en esta escala cada 5 semanas (Gordon, Miller and Moore, 2004). Recientemente se ha introducido la escala *ROADs (Rasch-Built Overall Amyotrophic Lateral*

Sclerosis Disability Scale) que parece adaptarse mejor al curso de la enfermedad que la ALSFRS-R (Fournier *et al.*, 2019).

Para evaluar el trastorno cognitivo, presente en más de la mitad de los pacientes que, por sus condicionantes de deterioro físico y del lenguaje, ninguna de las técnicas actuales es adecuada en la ELA y se precisan estudios más pormenorizados para desarrollar una batería específica.

1.5.5. Tratamiento

Actualmente no existe ningún tratamiento curativo para esta enfermedad. Hay dos medicamentos aprobados para su uso en la enfermedad, Riluzole en Europa y Edaravone en EE.UU y Japón.

El Riluzole es un aminoácido ramificado que bloquea la unión del glutamato con su receptor. De tal manera que disminuye uno de los eventos patogénicos de la ELA: la excitotoxicidad del glutamato en las neuronas motoras (Cheah *et al.*, 2010; Blasco *et al.*, 2014).

El Edaravone es un medicamento anteriormente usado en patología vascular cerebral y aprobado para su uso en pacientes con ELA desde el año 2015 en Japón y más recientemente, por la FDA en Estados Unidos. Se trata de un medicamento cuyo mecanismo de acción teórico es la inhibición del daño oxidativo mediado por radicales libres y su principal efecto adverso es la aparición de lesiones cutáneas y equimosis en relación con las venopunciones repetidas. En un ensayo con criterios muy restringidos con pacientes en fases muy iniciales de la enfermedad y con ritmo de progresión clínica alto, los pacientes tratados mostraban un efecto muy modesto del tratamiento sobre la progresión en la escala funcional de la enfermedad a seis meses, y no mostró efecto sobre la supervivencia (Abe *et al.*, 2017). En ningún caso estos tratamientos revierten o detienen la progresión de la enfermedad.

Se han probado otros muchos fármacos que han surgido de la investigación en los mecanismos de patogenicidad, como: celecoxib, gabapentina, ciclosporina, coenzima Q10, creatina, dextrometorfano, IGF-1, INF- β 1 α , memantina, minociclina, nimodipino, selegidina, talidomida, topiramato,

vitamina E, ceftriaxona, dexpropamipexol, litio, talampanel, etc., sin obtenerse resultados beneficiosos (Gibbons *et al.*, 2018).

Dada la carencia de herramientas terapéuticas eficaces y la rápida progresión de la sintomatología en la mayoría de pacientes, se propugna que sean atendidos en unidades multidisciplinarias con presencia de neurólogos, neumólogos, nutricionistas, especialistas en el aparato digestivo, rehabilitadores, fonoatras, fisioterapeutas, psicólogos, psiquiatras y trabajadores sociales. El objetivo de estas unidades multidisciplinarias consiste en poder ofrecer la mejor calidad de vida posible, y que tanto el paciente como los cuidadores estén apoyados a lo largo de todo el proceso. Existen evidencias que demuestran que la atención a los pacientes con ELA en estas unidades aumenta la supervivencia y mejora la calidad de vida de los pacientes y sus familias (Boylan *et al.*, 2016).

1.5.6. Otras aproximaciones terapéuticas

Dado que a lo largo de los últimos 20 años son decenas los tratamientos ensayados con éxito nulo, además, se han ensayado terapias celulares en las que después de los trasplantes de células, algunos pacientes mostraron una estabilización transitoria de la progresión de la enfermedad, aunque los mecanismos biológicos subyacentes de estos efectos beneficiosos siguen siendo especulativos (Mazzini *et al.*, 2003, 2016; Deda *et al.*, 2009; Martínez *et al.*, 2009). En el modelo de ratón *mdf* de neurodegeneración con signos clínicos y patológicos establecidos de pérdida progresiva de motoneuronas espinales (Blot, Poirier and Dreyfus, 1995), tras infundir células madre hematopoyéticas en la médula espinal, los ratones experimentaron una mejora funcional así como un aumento en el número de motoneuronas, en el asta anterior de la médula espinal, en comparación con los ratones controles. En estos estudios se vio que las células injertadas expresaban niveles elevados del factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) y que se posicionaban rodeando a las motoneuronas (Moraleda *et al.*, 2006; Cabanes *et al.*, 2007; Pastor *et al.*, 2012). Otro estudio en el ratón SOD1

(G93A) también demostró los beneficios de la terapia celular intramuscular con respecto al aumento de las motoneuronas y la progresión de la enfermedad (Rando *et al.*, 2018).

Existen actualmente, múltiples ensayos clínicos en curso (fases I-III) en los que se testan nuevas terapias farmacológicas. Se pueden señalar entre otros: el ensayo en fase I con el metabolito oxalacetato que participa en numerosas vías metabólicas (*Trial of Oxaloacetate in ALS, ClinicalTrials.gov, 2020*), el ensayo en fase II del Talampanel, un antagonista de los receptores glutamatérgicos de tipo AMPA (*Talampanel for Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) ClinicalTrials.gov, 2010*) o el ensayo fase III con Ibudilast, inhibidor de la fosfodiesterasa 4 (PDE4) (*A Biomarker Study to Evaluate MN-166 (Ibudilast) in Subjects With Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS), ClinicalTrials.gov, 2016*).

2. EL MÚSCULO ESQUELÉTICO Y LA ELA

2.1. El tejido muscular. Morfología funcional y metabolismo

El tejido muscular tiene diferentes subespecializaciones diferenciándose en músculo liso y músculo estriado. A su vez, el músculo estriado se clasifica en músculo estriado cardíaco, músculo estriado visceral y músculo estriado esquelético (Brüel *et al.*, 2014).

El tejido muscular esquelético tiene como función fundamental el movimiento del cuerpo y extremidades, a través de la contracción de las miofibrillas. Por otro lado, se encarga de las funciones de mantenimiento de la postura, sostén y protección de los órganos internos. Además, tiene también una función metabólica importante como regulador de la homeostasis energética. El músculo esquelético está compuesto por unas células altamente especializadas; las fibras musculares (Frontera and Ochala, 2015). A diferencia de otros tejidos, son células multinucleares o sincitios rodeados de vainas conjuntivas, ricamente inervadas y vascularizadas.

2.1.1. Composición del músculo esquelético y tipo de fibras musculares

Como ya se ha mencionado, las fibras musculares son multinucleadas como resultado de la fusión de las células precursoras llamadas mioblastos que al fusionarse forman el sincitio celular. Los núcleos de la fibra muscular originalmente se encuentran en posición central en las fibras inmaduras y posteriormente se posicionan debajo de la membrana plasmática que se

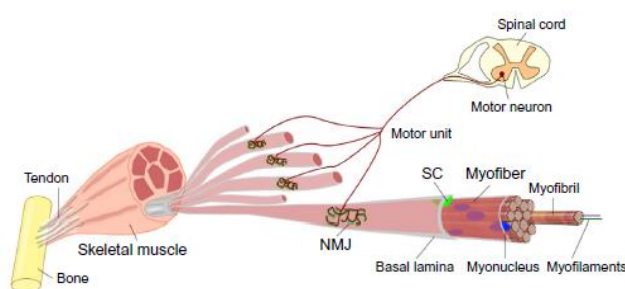


Figura 7. Esquema de la organización del músculo. (Liu and Chakkalakal, 2018).

le llama sarcolema, en la periferia de la fibra (Frontera and Ochala, 2015).

Las fibras musculares forman haces envueltas y sostenidas por tejido conjuntivo. La capa de este tejido que

rodea la fibra muscular se llama *endomisio*. La agrupación de fibras musculares forma un fascículo muscular que estará rodeado de tejido conectivo conocido como *perimisio*. Este fascículo constituye una unidad funcional que lleva a cabo una función específica. La agrupación de fascículos forman los haces de cada músculo diferenciado que es una estructura muscular independiente que se inserta en el tejido óseo y que recibe una inervación y vascularización específica, por lo que recibe un nombre identificativo propio (bíceps, cuádriceps, sóleo, etc.). Cada una de estas estructuras individuales está protegida por una capa más densa de tejido conectivo conocido como *epimisio* (Liu and Chakkalakal, 2018) **(figura 7)**. Los extremos del músculo conectan con los tendones que son estructuras de fibras colagénicas que fijan el músculo al hueso (*Fundamentals of Human Physiology - Lauralee Sherwood, 2011*).

La fibra muscular individual se compone a su vez de unas fibras longitudinales conocidas como miofibrillas que aportan el aspecto estriado a la fibra muscular. Estas miofibrillas son las unidades de contracción y están compuestas esencialmente por las proteínas contráctiles, actina y miosina, que representan un 70-80% del contenido proteico total de una fibra muscular (Frontera and Ochala, 2015). Además, la fibra muscular contiene otras proteínas estructurales como la troponina, la tropomiosina, o la titina que se organizan espacialmente formando el sarcómero (Ottenheijm and Granzier, 2010; Monroy *et al.*, 2012). El sarcómero constituye la unidad básica morfológico-funcional de la contracción y está integrado por dos líneas Z. El sarcómero está en contacto con las mitocondrias, glucógeno y el retículo endoplásmico liso que en el músculo es conocido como retículo sarcoplásmico (Ogata and Yamasaki, 1993; Sorrentino and Gerli, 2003; Frontera and Ochala, 2015) .

Las fibras musculares esqueléticas se van a clasificar según su actividad metabólica y su velocidad de contracción (Schiaffino and Reggiani, 2011; Galpin *et al.*, 2012; Liu, Mac Gabhann and Popel, 2012). El perfil metabólico viene dado por el tipo de ruta metabólica preferentemente utilizada por la fibra para obtener el ATP destinado a la contracción: la fosforilación

oxidativa o la glucólisis (Qaisar, Bhaskaran and Van Remmen, 2016). De acuerdo a esto se diferencian tres tipos de fibras:

- ✓ *Fibras de tipo I, fibras oxidativas lentas o fibras rojas.* Como su propio nombre indica son fibras de color rojo por su alto contenido en mioglobina, una proteína fijadora de oxígeno similar a la hemoglobina de los eritrocitos. La mioglobina proporciona a las fibras musculares el oxígeno inmediato para las reacciones bioquímicas. En este tipo de fibras también abundan las mitocondrias. Estas fibras forman **unidades motoras de contracción lenta resistente a la fatiga**, propias de la musculatura del dorso de los seres humanos que se caracteriza por contracciones lentas y prolongadas necesarias para mantener la posición erecta. Estas fibras son típicas de los corredores maratonianos.

- ✓ *Fibras del tipo IIa o fibras glucolíticas oxidativas.* Estas fibras son las intermedias entre las fibras rojas y las blancas. El tamaño de esta fibra es mayor que el de las fibras oxidativas de tipo I. Tienen una gran cantidad de mitocondrias y de mioglobina. También van a tener, a diferencia de las oxidativas puras, una gran cantidad de glucógeno destinado a la glucólisis anaeróbica que también se da en este tipo de fibra. Por eso, este tipo de fibra constituye la **unidad motora de contracción rápida resistente a fatiga**. Estas fibras son características de la musculatura de las extremidades de los corredores de medio fondo.

- ✓ *Fibras de tipo IIb, fibras glucolíticas anaeróbicas o fibras blancas.* Estas fibras son las más grandes y son de color blanco. Este color se debe a los depósitos de glucógeno que va a ser el combustible para la glicólisis anaeróbica. En estas fibras las mitocondrias y la mioglobina son escasas. Son las **unidades motoras de contracción rápida propensas a la fatiga**. Son fibras utilizadas para realizar movimientos de precisión como los realizados por los dedos. Estas fibras presentan más uniones neuromusculares para llevar a cabo un control neural más preciso. Los corredores de distancias muy cortas, con alto nivel de demanda

energética en poco tiempo, son los que tienen en abundancia este tipo de fibras.

2.1.2. Inervación muscular

La unidad motora funcional está compuesta por la fibra muscular estriada esquelética y la motoneurona. Las neuronas motoras que provienen de la medula espinal y del tronco del encéfalo inervan a las fibras musculares esqueléticas (**figura 8**). Cada neurona más el conjunto de fibras musculares que inerva se conoce como unidad motora (Larsson and Ansved, 1995; Sanes and Lichtman, 1999).

Estas neuronas se ramifican y finalizan en las uniones neuromusculares, también llamadas placas motoras, en las que las ramificaciones inervan de forma perpendicular a la fibra muscular horizontal (Larsson and Ansved, 1995; Sanes and Lichtman, 1999). Una neurona puede inervar desde una hasta

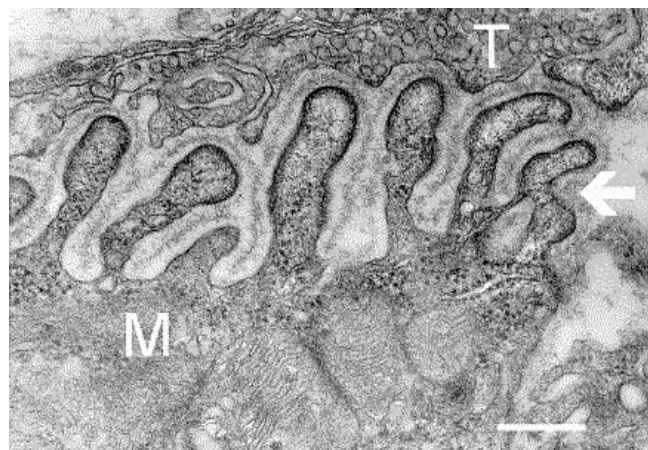


Figura 8. Placa motora. T, axón terminal, M, fibra muscular. Flecha, lámina basal. Synapse Web at the National Institute of Mental Health.

un centenar de fibras musculares. Para los músculos encargados de ejecutar los movimientos muy frecuentes y precisos, como los músculos extrínsecos de los ojos, la cantidad de fibras musculares inervadas por neurona es menor llegando a la proporción de una neurona motora por cada tres fibras musculares. Sin embargo, las neuronas motoras del dorso inervan hasta casi un centenar de fibras musculares.

En esta zona distal, la vaina de mielina se pierde y la neurona motora queda cubierta por una fina capa constituida por una delgada porción de célula de Schwann (Court *et al.*, 2008). Esta zona, conocida como región presináptica, contiene un gran número de mitocondrias necesarias para la

obtención de energía, destinada a la liberación de vesículas contenientes del neurotransmisor acetilcolina (Sanes and Lichtman, 1999).

La membrana plasmática de la placa motora muscular tiene una serie de pliegues por los que aumenta la superficie de contacto entre el axón y la fibra muscular. En estos pliegues se encuentran una gran cantidad de transportadores, proteínas de membrana y receptores celulares. Entre estos últimos, los receptores de acetilcolina (AChR) tienen una importancia especial pues son mediadores de la contracción muscular (Liu and Chakkalakal, 2018) **(figura 9)**.

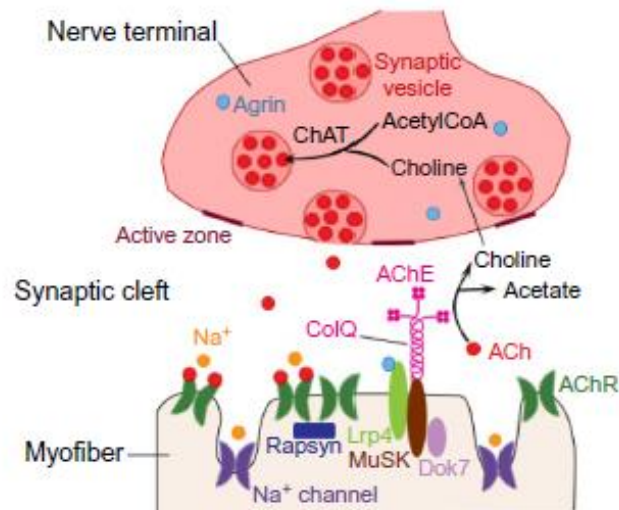


Figura 9. Moléculas necesarias para la unión neuromuscular. ChAT, acetilcolina transferasa; ACh, acetilcolina; AChE, acetilcolinesterasa; AChR, receptor de acetilcolina. Modificada de Liu and Chakkalakal, 2018.

Cuando la acetilcolina se libera en la hendidura sináptica se une a sus receptores específicos, éstos se abren y entran iones de sodio (Na^+) que producen una despolarización local de la membrana. Esta despolarización del sarcolema va a activar los canales de Na^+ dependientes de voltaje y se produce una entrada de Na^+ en la célula. Esta entrada va a producir una despolarización generalizada del sarcolema que llega hasta una depresión de la membrana plasmática en forma de T, los llamados los túbulos T (Bellinger, Mongillo and Marks, 2008) **(figura 10)**.

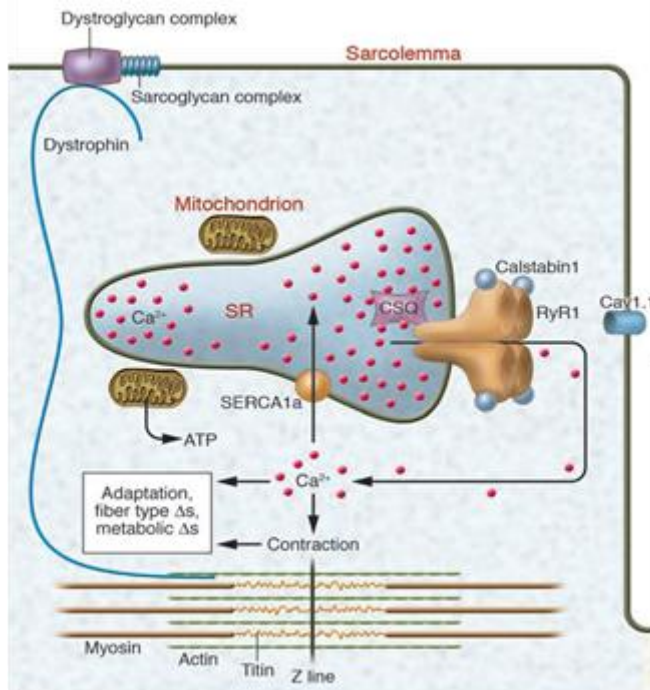


Figura 10. Mecanismo molecular de la contracción muscular. RyR, receptor de rianodina; Cav 1.1. Transportador de Ca²⁺ dependiente de voltaje. Modificada de Bellinger, Mongillo and Marks, 2008.

Las proteínas sensoras de voltaje cambian su conformación y activan la apertura de canales de Ca²⁺ pertenecientes a la familia de las rianodinas (RyRs), encargadas de extraer el Ca²⁺ del retículo endoplásmico (RE) hacia el citoplasma. Este Ca²⁺ se une a la Troponina C del sarcómero y se inicia el proceso de contracción muscular. Tras la contracción, el Ca²⁺ vuelve a entrar al RE, a través de un transporte dependiente de energía en

forma de ATP mediada por los canales conocidos como SERCAs (**figura 10**). Un punto muy importante a tener en cuenta en la bioenergética muscular es que la energía no se necesita solamente para la contracción muscular propiamente dicha, sino también para su relajación. La energía en forma de ATP es necesaria para restablecer las reservas de Ca²⁺ del RE y preparar al músculo para la siguiente contracción, evitando así la contracción continuada del músculo. El fenómeno de contracción muscular es un proceso de todo o nada, es decir, es necesaria la llegada de un potencial que alcance el umbral de voltaje para que se produzca la apertura de los canales de Na⁺ y esto sucede de forma no simultánea para que las fibras musculares se contraigan de una forma gradual (*The physiology of excitable cells: Aidley, David J., 1971*)

2.1.3. Metabolismo muscular

La energía requerida para suplir las demandas celulares, incluida la contractibilidad del músculo, proviene de la hidrólisis del ATP en ADP y Pi. Una característica única de las fibras musculares esqueléticas es el hecho de que pueden sufrir un aumento repentino del consumo de energía, al cambiar de reposo a contracción. La mayor parte del consumo basal de ATP, en las fibras musculares en reposo, proviene de la síntesis de proteínas y del mantenimiento de la bomba Na^+/K^+ , una ATPasa que mantiene el potencial de membrana en reposo. Este consumo de energía basal es similar en los distintos tipos de fibras musculares (Rolfe and Brown, 1997). Cuando la fibra se contrae, la ATPasa miosina consume un 70% de la energía contráctil, mientras que el transporte iónico mediado por las ATPasas tipo SERCA del RE, un 30% (Homsher, 1987). Para poder suplir estos rápidos cambios energéticos, la célula muscular necesita mecanismos eficientes de recuperación de ATP. Los tres mecanismos de síntesis de ATP más importantes en fibras musculares son: la actividad creatina quinasa, la glucólisis y la fosforilación oxidativa mitocondrial.

2.1.3.1. Sistema creatina quinasa-adenilato quinasa

La fosfocreatina (PCr), sustrato de la enzima creatina quinasa (CK), es una fuente disponible de grupos fosforilo para la síntesis rápida de ATP, a través de la fosforilación del ADP ($\text{ADP} + \text{PCr} \leftrightarrow \text{ATP} + \text{Cr}$). La velocidad de obtención de ATP para la contracción muscular a través del sistema CK-adenilato quinasa, es mucho mayor que la de las rutas catabólicas convencionales. En periodos de relajación, parte del ATP que proviene de estas rutas se destina a la regeneración de las reservas de fosfocreatina. Tanto el contenido de PCr como la actividad CK son más elevados en las fibras rápidas glucolíticas tipo II (a y b) (Ventura-Clapier *et al.*, 1998). Estas fibras rápidas consumen un 30% de ATP y gran cantidad de PCr en sólo 10 segundos de ejercicio máximo, y un fallo energético en ellas implica una

reducción considerable en la potencia muscular, conduciendo a la fatiga (Sargeant, 2007).

El consumo de ATP produce un aumento en la concentración de ADP y P_i . Este ADP también puede transformarse directamente en ATP a través de una reacción catalizada por la adenilato quinasa (AK), que convierte dos moléculas de ADP en una de ATP y una de AMP. Durante una contracción intensa aumenta la concentración de AMP, con lo que aumentan los niveles de inosina monofosfato (IMP) a través de una reacción de desaminación catalizada por la AMP desaminasa (AMPD), enzima también con mayor concentración y actividad en las fibras glucolíticas (Sahlin *et al.*, 1997).

2.1.3.2. La glucolisis y los sistemas “lanzadera”

La glucolisis (del griego *glykys*, “dulce” y *lisis*, “romper”) es una vía metabólica universal y central del metabolismo de la glucosa. Se trata de un conjunto de reacciones bioquímicas en las que la glucosa se transforma en dos moléculas de tres carbonos (dos moléculas de piruvato). Esta vía fue descubierta en levaduras por Eduard Buchner en 1897, para completar su estudio posteriormente, Otto Warburg y Hans von Euler-Cheplin (Warburg, Wind and Negelein, 1927), y en el músculo, Gustav Embdem y Otto Mejerhof en 1930 (Kohler, 1971). A lo largo de las consecutivas reacciones de esta vía, se libera energía en forma de ATP y coenzima de reducción NADH, con lo que para mantener la vía activa es necesaria la reposición del coenzima oxidado NAD^+ . En la mayoría de las células, la glucolisis coexiste con la oxidación de ácidos grasos como fuente de energía, pero hay determinados tipos celulares y tejidos en los que, en situaciones fisiológicas, la glucosa es el único combustible: los eritrocitos, el cerebro, el espermatozoide y la médula renal. Además, la glucolisis puede ser aerobia o anaerobia, según el destino del piruvato. Si el piruvato se transforma en lactato a través de la fermentación láctica, la glucolisis es anaerobia ya que el O_2 no participa como último aceptor de electrones. Por otra parte, si el destino del piruvato es la oxidación hasta CO_2 y H_2O en la mitocondria, estaremos ante una

glucólisis *aerobia* que va a resultar una vía no tan rápida pero más eficiente de obtención de energía que la glucólisis anaerobia. Por eso, como se ha confirmado en diferentes estudios en humanos y en ratones, en las fibras rápidas anaeróbicas la expresión de genes glucolíticos es mayor que en las fibras lentas (Plomgaard *et al.*, 2006; Chemello *et al.*, 2011). En cualquier caso, la rotura de la glucosa en dos moléculas de piruvato, se produce en diez etapas las cuales se pueden agrupar en dos fases: una primera fase de consumo de energía y una segunda fase de obtención de energía (Nelson and Cox, 2008) (**figura 11**).

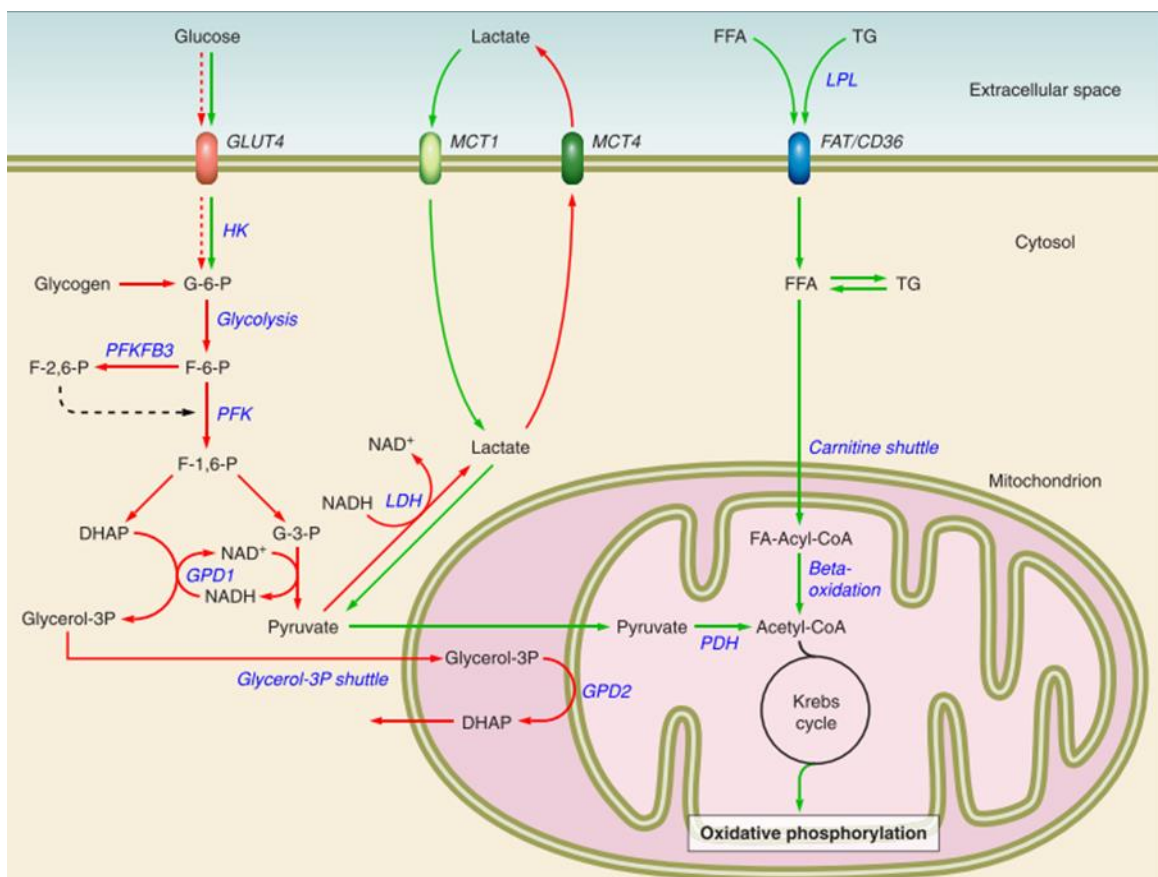


Figura 11. Esquema de las diferencias de expresión de las enzimas en el metabolismo de la glucosa, lactato y los ácidos grasos. Las reacciones metabólicas prevalentes en las **fibras rápidas** y **lentas** están descritas de color rojo y verde, respectivamente. DHAP, dihidroxiacetona fosfato; GLUT4, transportador de glucosa 4; F6P, fructosa 6-fosfato; F2,6P, fructosa 2,6 bisfosfato; FAT/CD36, translocasa de ácidos grasos; F1,6P, fructosa 1,6 bisfosfato; G3P, gliceraldehído 3 fosfato; G6P, glucosa 6-fosfato; GPD1, glicerol 3-fosfato deshidrogenasa 1 (citoplasmática); GPD2, glicerol 3-fosfato deshidrogenasa 2 (mitocondrial); HK, hexoquinasa; LDH, lactato deshidrogenasa; MCT1, transportador de ácidos monocarboxílicos 1; MCT4, transportador de ácidos monocarboxílicos 4; PDH, piruvato deshidrogenasa; PFK, fosfofructoquinasa; PFKFB3, 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa 2,6bisfosfatasa ; TG, triglicéridos. Modificada de Schiaffino and Reggiani, 2011.

En la primera fase, al producirse dos sucesivas fosforilaciones van a ser necesarias dos moléculas de ATP. En esta fase, se producen dos de las tres reacciones reguladoras de la velocidad de la vía. Estas reacciones son unidireccionales y están catalizadas por enzimas específicas y que van a tener diferentes isoformas dependiendo del tejido en el que se encuentren. En el músculo esquelético, la primera reacción reguladora está catalizada por la Hexoquinasa II que fosforila a la glucosa. En la tercera reacción, la fosfofructoquinasa muscular (PFKM) cataliza la reacción reguladora más importante de la vía. A su vez, la actividad de esta enzima viene regulada por otra enzima, la fosfofructoquinasa 2/fructosa-bisfosfatasa 3 (PFK2/PFKBF3 en músculo); una enzima responsable de la obtención de la fructosa 2,6-bisfosfato, un potente activador de la PFKM y de la glucólisis (Hers, 1984). Asimismo, la actividad de la PFK2 está regulada por las hormonas insulina, glucagón y adrenalina, dependiente del tejido: 1) en el hígado, la insulina activa la PFK2, y la adrenalina y el glucagón inhiben la síntesis de fructosa 2,6 bisfosfato y con ello la glucólisis; 2) en el tejido muscular, la insulina y la adrenalina activan la PFK2. Por ello, gracias a la exquisita regulación enzimática de la endocrinología, se establece la existencia de diferentes isoformas en los diferentes tejidos de la PFK2 para poder explicar cómo una misma hormona, la adrenalina, es capaz de producir efectos contrarios sobre una misma proteína; es decir, activar la enzima en un tejido (músculo), a la vez que inhibirla en otro (hígado). En la fase de obtención de energía, se encuentra la tercera reacción irreversible reguladora de la velocidad de la glucólisis y que es la reacción catalizada por la enzima piruvato quinasa (PKM muscular). En esta fase glucolítica de beneficios, se obtienen cuatro moléculas de ATP y dos moléculas de NADH, con el consecuente consumo de dos coenzimas NAD^+ que se tienen que recuperar para mantener la vía activa (*The Enzymes of glycolysis : structure, activity, and evolution : a Royal Society discussion held on 16 and 17 October 1980 / organized by Sir David Phillips, C.C.F. Blake, and H.C. Watson.*; Albery and Knowles, 1977; Boiteux and Hess, 1981; Kresge, Simoni and Hill, 2005).

Tres sistemas metabólicos celulares intervienen en la regeneración del NAD⁺: la fermentación láctica, la lanzadera de malato-aspartato y la lanzadera de glicerol 3-fosfato (Cooney and Dawson, 1979) (figura 11).

2.1.3.2.1. La fermentación láctica

Esta reacción metabólica podría ser la más antigua de toda la bioquímica metabólica, porque al no requerir oxígeno estaba presente ya en los organismos más sencillos cuando las condiciones atmosféricas eran anaeróbicas. En ella el piruvato se transforma en lactato mediante la lactato deshidrogenasa A (LDHA) y es necesaria para regenerar el coenzima NAD⁺ citosólico. En esta reacción se consume NADH aunque también puede funcionar a la inversa, produciendo NADH y consumiendo NAD⁺, mediante la enzima lactato deshidrogenasa B (LDHB) que transforma el lactato en piruvato. Dependiendo del tipo de fibra muscular habrá un predominio de una u otra enzima: en las fibras lentas oxidativas debido a que en este caso, es necesaria la entrada del piruvato a la mitocondria para su oxidación hasta CO₂, hay más presencia de LDHB, y el lactato que entra desde el espacio extracelular se utiliza como combustible para la obtención de piruvato. Esta enzima, también se encuentra en las neuronas que, en este caso, actúan de forma similar aunque la fuente de lactato principal para la neurona venga de la glía, más concretamente de los astrocitos (Falkowska *et al.*, 2015). Las fibras rápidas glucolíticas expresan mayoritariamente la isoforma LDHA y liberan al espacio extracelular el lactato (Markert, Shaklee and Whitt, 1975) (**figura 12**).

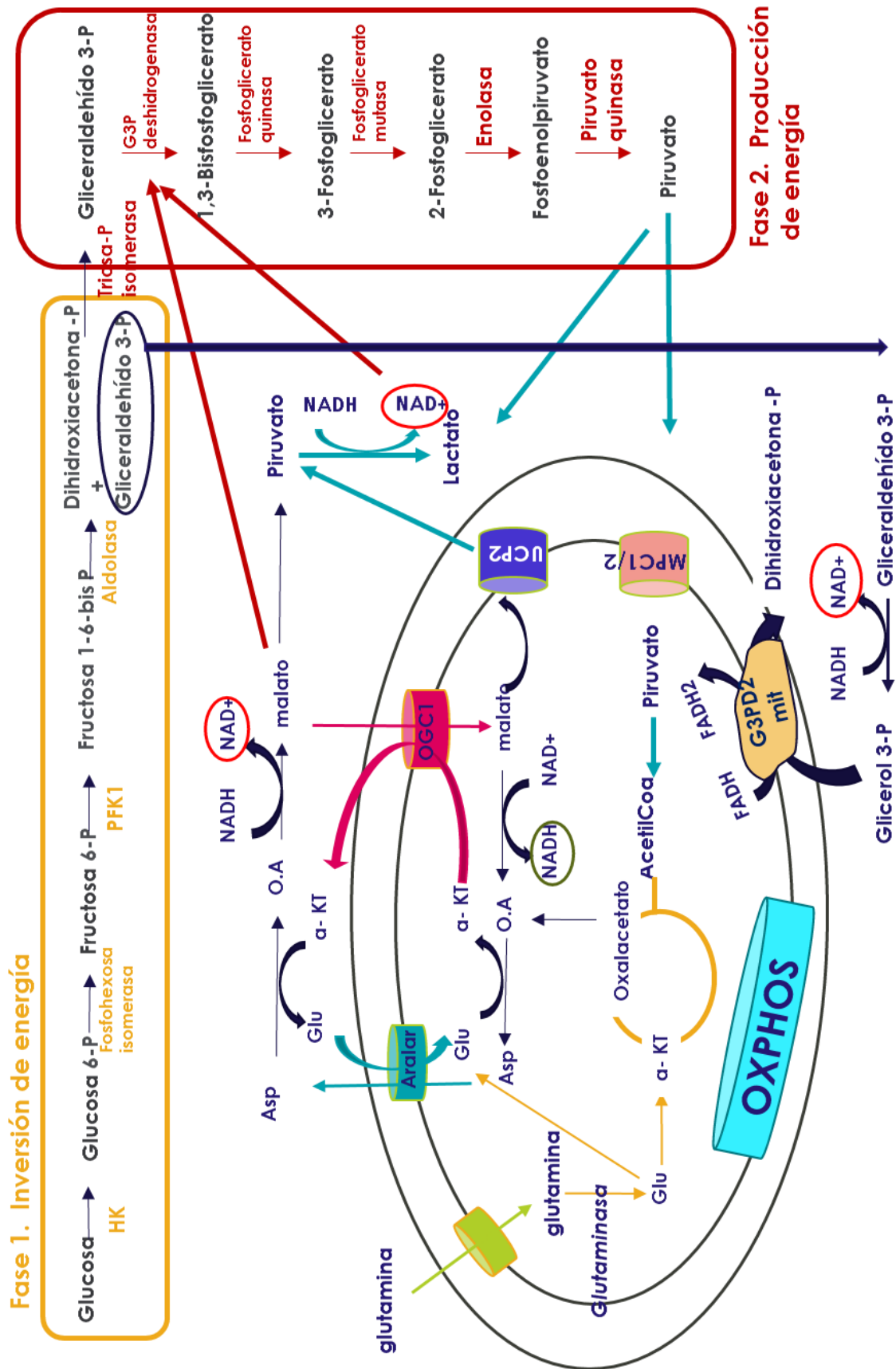


Figura 12. Resumen de la regulación de la glucólisis.

2.1.3.2.2 La lanzadera malato-aspartato (M-A)

Aunque sí que es cierto que esta lanzadera regenera el NAD^+ citosólico, también se utiliza para introducir equivalentes de reducción NADH no a través de su transporte directo sino indirecto. No existe ningún transportador de membrana interna mitocondrial de NADH, ni esta membrana es permeable a este coenzima (Purvis and Lowenstein, 1961), con lo que la célula necesita de sistemas especiales tipo lanzadera. La lanzadera de malato-aspartato consiste en una serie de reacciones de oxido-reducción, en las que participa el NADH/NAD^+ , a través de las cuales se obtienen diferentes metabolitos receptores y donadores de electrones y protones, que van a ser transportados al citosol y a la matriz mitocondrial, por medio de sus transportadores específicos. Este sistema, la lanzadera de malato-aspartato (M-A), constituye un mecanismo de comunicación entre la mitocondria y el citosol, por el que las vías anaeróbica y aeróbica no sólo están relacionadas sino que se coordinan y acúan simultáneamente (LaNoue and Williamson, 1971).

En la lanzadera M-A hay dos proteínas transportadoras tipo antiporte localizadas en la membrana interna mitocondrial: el transportador de aspartato-glutamato (AGC1/Aralar1) y el transportador de oxoglutarato-malato (OGC1). Estos transportadores constituyen el factor limitante de la funcionalidad de la lanzadera (Schoolwerth, LaNoue and Hoover, 1984). La lanzadera M-A está formada por las enzimas citosólicas aspartato aminotransferasa 1 (GOT1) y malato deshidrogenasa 1 (MDH1), y las enzimas mitocondriales, aspartato aminotransferasa 2 (GOT2) y malato deshidrogenasa 2 (MDH2).

En las fibras musculares de tipo 1 los niveles de expresión de la lanzadera son 25% más altos que en las fibras rápidas. Esto hace que cuando hay una competición más efectiva por el NADH citosólico por parte de la MDH1 (citosólica), el NADH destinado inicialmente a la fermentación láctica, se desvía hacia la reacción catalizada por MDH1 para su posterior bombeo a la mitocondria. De esta manera, la dirección de la reacción regulada por la LDH se invierte y el lactato se transforma en piruvato (Schantz, Sjöberg

and Svedenhag, 1986). Esta modificación metabólica ocurre en las fibras oxidativas de tipo 1, en el corazón y en neuronas en las que el lactato es utilizado como combustible además de la glucosa.

Esta lanzadera permite un flujo correcto de metabolitos entre el citosol y la mitocondria que mantienen la glucólisis y la respiración mitocondrial activa. Otro transportador que participa en el flujo de metabolitos entre la mitocondria y el citosol y que interviene indirectamente en la regeneración del NAD^+ citosólico para la glucólisis, es la proteína desacoplante mitocondrial UCP2 (proteína 2 no acoplada; *uncoupled protein 2*) (Vozza *et al.*, 2014). Este transportador además de tener una función antioxidante (Arsenijevic *et al.*, 2000), bombea al citosol esqueletos carbonados de cuatro carbonos, malato y oxalacetato, y el aspartato, a expensas de introducir en la mitocondria fosfato inorgánico y protones (Vozza *et al.*, 2014). El malato y oxalacetato, provenientes del ciclo de los ácidos tricarbónicos o ciclo de Krebs, salen de la mitocondria y se incorporan a las reacciones de la lanzadera M-A, para regenerar el NAD^+ citosólico.

Otra fuente de estos metabolitos tetracarbonados proviene de la glutaminólisis, que es la reacción en la que la glutamina se transforma en glutamato por medio de la enzima glutaminasa. Este glutamato se incorpora posteriormente a la reacción de transaminación catalizada por la aspartato aminotransferasa mitocondrial (GOT2), que también forma parte de la lanzadera M-A, obteniéndose el aspartato que será transportado también por la UCP2 y por AGC1 al citosol. De este modo, la glutaminólisis, la UCP2 y la lanzadera M-A estarían directamente relacionadas.

Cuando la actividad de la UCP2 es alta, el acetil-CoA que se obtiene por la entrada de piruvato a la mitocondria a través del transportador MPC1/2 (*mitochondrial pyruvate carrier*), no encuentra para reaccionar el suficiente oxalacetato necesario para la primera reacción del ciclo de Krebs, ya que éste sale al citosol por la UCP2 y el ciclo se queda parcialmente inhibido, acumulándose acetil-Coa en la mitocondria. Como consecuencia, la reacción catalizada por la piruvato deshidrogenasa se satura y el piruvato se

desvía hacia la fermentación láctica activándose la glucólisis anaeróbica además de la glutaminólisis (Vozza *et al.*, 2014) (figura 13).

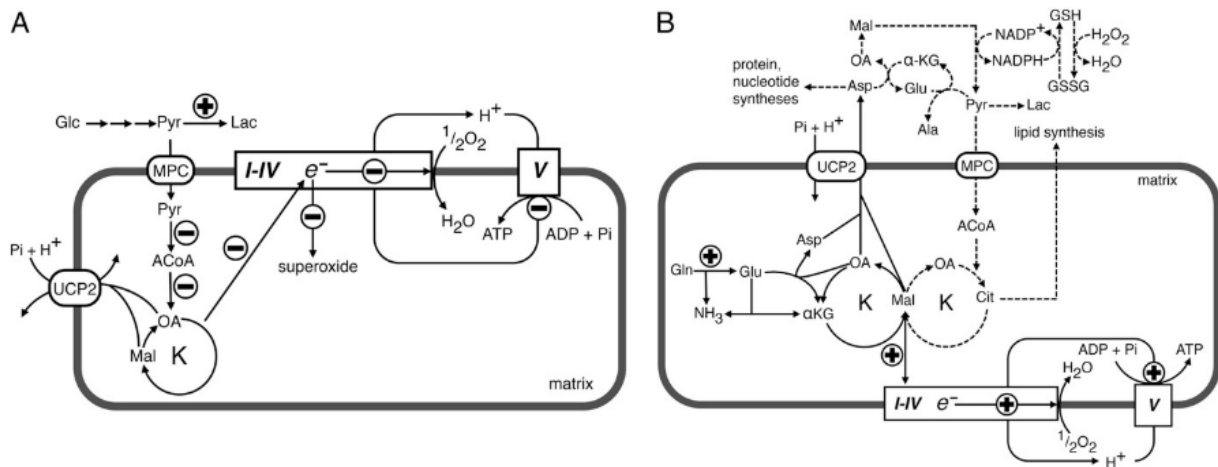


Figura 13. Influencia de la UCP2 en el metabolismo. (A) Role de la UCP2 en la oxidación de la glucosa y (B) role de la UCP2 en la oxidación de la glutamina. Signo +, activación de la reacción por la UCP2. Signo -, inhibición por parte de la UCP2. Modificada de Vozza *et al.*, 2014.

La UCP2 también puede activarse con los ácidos grasos, por los cuales se activa para transportar simultáneamente en antiporte, tanto los protones como los aniones disociados de los respectivos ácidos, mecanismo conocido como *flip-flop* (Ježek, Modrianský and Garlid, 1997). De esta manera, se desacopla el gradiente electroquímico de la mitocondria y de ahí su nombre de desacoplante (Nedergaard and Cannon, 2003).

Se conoce poco de la actividad UCP2 en músculo, pero se ha descrito que este transportador está sobreexpresado en células cancerosas por su función antiapoptótica, ya que controla la producción de especies reactivas de O₂ (ROS) en la mitocondria y aumenta los niveles de glutation reducido (GHS) en el citoplasma (Ayyasamy *et al.*, 2011). Por otro lado, las células cancerosas basan su metabolismo precisamente en las vías que activan la UCP2: el efecto Warburg y la glutaminólisis (Samudio *et al.*, 2008; Samudio, Fiegl and Andreeff, 2009; Ayyasamy *et al.*, 2011), siendo utilizada esta última para obtener intermediarios del ciclo de Krebs y desviarlos para otro tipo de reacciones de síntesis propias de las células tumorales (DeBerardinis *et al.*, 2007). Estas nuevas funciones regulatorias adjudicadas

a este transportador, que inicialmente se consideraba como una proteína que desacoplaba la cadena de transporte de electrones con la síntesis de ATP mitocondrial, sugieren una mayor importancia fisiológica de la UCP2 en procesos celulares relevantes para la supervivencia celular en el tejido muscular.

2.1.3.2.3. La lanzadera de glicerol 3-fosfato

En el músculo esquelético y en el cerebro, el sistema lanzadera de equivalentes de reducción más abundante, aunque no el único, es la lanzadera de glicerol 3-fosfato. La reacción glucolítica catalizada por la enzima aldolasa, hidroliza la fructosa 2,6-bisfosfato en dos triosas: gliceraldehído 3-fosfato (G3P) y dihidroxiacetona fosfato (DHAP). El G3P es sustrato de las sucesivas reacciones glucolíticas pero la DHAP es destinada para otro fin: la regeneración del coenzima NAD⁺. Aquí entra en juego la enzima citosólica y del espacio intermembrana mitocondrial, la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa 1 (GPD1), que transforma la DHAP en glicerol 3-fosfato consumiéndose un NADH y regenerando el NAD⁺ necesario para el mantenimiento de la vía. Posteriormente, el glicerol 3-fosfato, por acción de la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa 2 (GPD2) de la membrana interna mitocondrial, se transforma en DHAP generándose un ciclo neto de sustratos en el que el coenzima aceptor de electrones siendo el FAD se transforma en FADH₂. Este coenzima será sustrato de la respiración mitocondrial (figuras 10 y 11).

La velocidad de regeneración de NAD⁺ citosólico es mayor en esta lanzadera que en la de M-A. Por eso, la lanzadera de glicerol 3-fosfato marca una diferencia importante entre fibras rápidas y fibras lentas. En las fibras rápidas, la distribución de la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa 1 (GPD1) es mayor, y puede ser considerada como un marcador del metabolismo glucolítico (Peter *et al.*, 1972; Schiaffino and Reggiani, 2011). Este aumento en la expresión y por tanto, de la actividad de la GPD1 y

GPD2, se correlaciona con el aumento de expresión de otras enzimas glucolíticas (Hallauer and Hastings, 2002).

2.2. La atrofia muscular: mecanismos moleculares

El tejido muscular es el reservorio de proteínas más grande del cuerpo. El músculo sirve como fuente de aminoácidos durante períodos catabólicos como en el cáncer o en las sepsis, para compensar pérdidas en enteropatías o en las quemaduras, la insuficiencia cardíaca o el SIDA. En estos procesos, los aminoácidos liberados por la degradación de las proteínas musculares pueden usarse para la producción de energía por el corazón, el cerebro y el hígado. Sin embargo, la degradación excesiva de proteínas musculares puede desencadenar un estado caquéctico muy perjudicial para la supervivencia, agravando las enfermedades tanto agudas como crónicas (Schiaffino *et al.*, 2013).

El músculo que pierde la inervación motora se atrofia (Schiaffino *et al.*, 2013). La neurona enervante de la unidad motora, no sólo proporciona las moléculas señalizadoras que activan la función contráctil en el músculo, sino que constituye un soporte trófico imprescindible para el mantenimiento de la integridad estructural de la fibra muscular (Cangiano *et al.*, 1997). Al mismo tiempo, está demostrado que los factores derivados del músculo también promueven la supervivencia de las motoneuronas en cultivo (Calof and Reichardt, 1984; Dohrmann *et al.*, 1986; Dohrmann, Edgar and Thoenen, 1987; Juurlink, Munoz and Devon, 1991). Esta consideración del músculo como soporte trófico de la motoneurona, tiene una gran importancia en el estudio de la ELA como enfermedad neurodegenerativa ya que podría soportar un modelo patogénico (posiblemente no universal para todas las formas de ELA), que va del músculo a la motoneurona, *bottom-up*, a partir de una afectación muscular inicial.

El músculo como todos los tejidos, tiene su propio potencial regenerativo para hacer frente a los insultos externos o noxas internas. Este potencial está representado por las células progenitoras residentes (*muscle stem cells*),

conocidas como células satélite, que se encuentran entre la lámina basal y la membrana plasmática de las fibras (Mauro, 1961). Estas células miogénicas indiferenciadas son responsables de la miogénesis primaria que conduce al desarrollo postnatal del músculo hasta alcanzar la madurez total, así como del mantenimiento de la homeostasis durante la edad adulta. La miogénesis primaria comienza en el estado embrionario cuando las células madre pluripotenciales provenientes del mesodermo (Campion, 1984), expresan los genes Pax3 y Pax7 (Asfour, Allouh and Said, 2018), se convierten en progenitores musculares y comienzan a expresar Myf5 y MyoD, que son factores de transcripción del programa miogénico, para transformarse en mioblastos. Estos mioblastos expresan gradualmente otro factor del programa miogénico, miogenina (Myog), transformándose así en miocitos y miotubos uninucleares nacientes. Posteriormente, al fusionarse estas células es cuando aparecen los miotubos multinucleares que expresan las proteínas que constituyen la unidad contráctil muscular madura: el sarcómero (Sun *et al.*, 2011). En el músculo maduro quedan como residentes algunas células progenitoras, las denominadas células satélites, que servirán además, como soporte para la miogénesis secundaria ante cualquier insulto durante el periodo postnatal. Todo este proceso de miogénesis viene acompañado por cambios fenotípicos en el metabolismo energético, por los cuales las diferentes estirpes celulares presentan diferentes preferencias metabólicas (Garbugino *et al.*, 2018; Tseng *et al.*, 2019) **(figura 14)**.

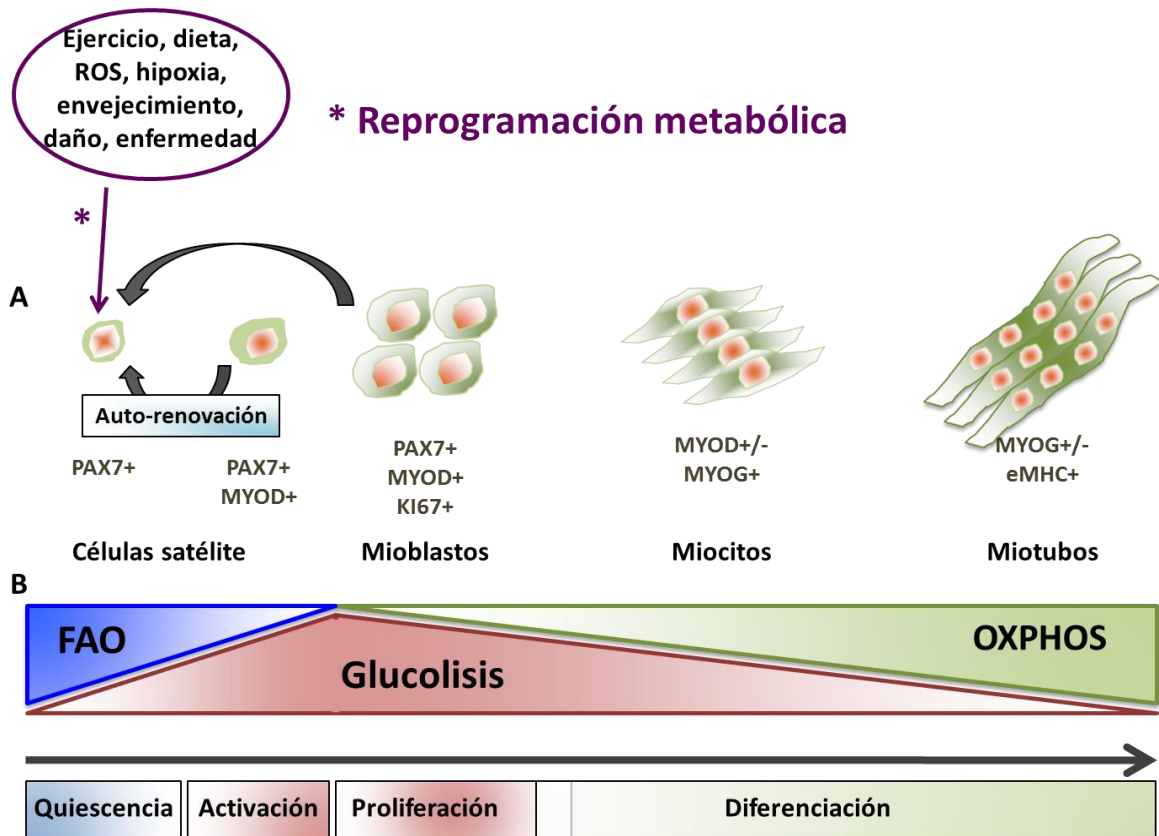


Figura 14. Reprogramación metabólica en células madre musculares. (A) Las células satélite (CS) del músculo adulto: capacidad miogénica y mantenimiento del reservorio. En quiescencia las CS expresan PAX7 pero en caso de lesión o señalización externa se activan y co-expresan el factor regulador miogénico (MRF) MYOD. Durante la proliferación (PAX7+/MYOD+/KI67+) las CS pueden auto-renovarse para restablecer el reservorio re-entrando en quiescencia (PAX7+/MYOD-/KI67-). La mayoría de las CS continúan con el proceso miogénico y se diferencian (PAX7-) manteniendo la expresión de MYOD y activando el otro MRF, la miogenina (MYOG). Finalmente, los mioblastos originados se fusionarán entre ellos para formar miotubos multinucleados o con las miofibras existentes para regenerarlas completamente, que inicialmente expresan la forma embrionaria de la miosina (eMHC). (B) Mecanismos bioenergéticos que regulan la miogénesis derivada de las células madre musculares. Durante la transición de la quiescencia a la proliferación, las CS experimentan cambios extremos tanto de tamaño como de actividad metabólica. La activación y expansión de las CS implica un aumento en la glucolisis, mientras que la oxidación de los ácidos grasos y el piruvato (FAO) aumenta durante la salida del ciclo celular (diferenciación o reingreso al estadio de quiescencia). La salida del ciclo celular promueve la activación de los genes implicados en la fosforilación oxidativa (OXPHOS) y el metabolismo mitocondrial durante el proceso de diferenciación. Diagrama realizado en base a (Garbugino et al., 2018; Tseng et al., 2019).

Las células satélite, a través de un proceso de activación, proliferación, diferenciación, maduración e invasión, darán lugar a los distintos tipos de fibras en función del tipo de miosina que expresen (Glaser and Suzuki, 2018). Al mismo tiempo, un pequeño porcentaje de estas células entrará de nuevo en quiescencia, para constituir así el reservorio de células madre que

contribuye al mantenimiento de una correcta homeostasis del tejido y respuesta ante futuros insultos (Relaix and Zammit, 2012).

Las células satélite intervienen también en el mantenimiento de la masa muscular y en la hipertrofia en la etapa adulta (Amthor *et al.*, 2009; Sartori *et al.*, 2009). Se ha visto en diversos estudios una disminución en el número y actividad de estas células durante condiciones de atrofia y en la sarcopenia propia del envejecimiento (McKenna and Fry, 2017), perdiendo así capacidad regenerativa.

En el músculo, la degradación y síntesis de proteínas están altamente reguladas por diferentes vías de señalización. Cuando existe un estado de necesidad energética en las células musculares, un aumento de estrés oxidativo o una deficiencia en la vía de señalización de insulina, entre otras, se activan los sistemas proteolíticos y el equilibrio proteostático se desplaza hacia la degradación, siendo precisamente éste el momento en el que aparece la atrofia muscular.

La atrofia muscular se define clínicamente como una disminución en el tamaño de la célula causada por la pérdida de orgánulos, citoplasma y proteínas. Una disminución en la masa muscular y del tamaño de la fibra, puede ser secundaria a diversos procesos como el envejecimiento (sarcopenia), el ayuno, la caquexia ligada al cáncer, la diabetes, la atrofia secundaria a largos periodos de inmovilización, la denervación por sección nerviosa o por enfermedades de las neuronas motoras, y la estimulación hormonal catabólica (corticosteroides) (Schiaffino, Kenneth A. Dyar, *et al.*, 2013).

Los mecanismos celulares por los que se regula la degradación de las proteínas son principalmente la autofagia, la autofagia mediada por chaperonas (CMA) y el sistema ubiquitin-proteasoma (UPS). De hecho, tanto la autofagia como el proteasoma son los mecanismos proteolíticos más importantes que intervienen en la atrofia muscular (Bonaldo and Sandri, 2013). Estos mecanismos están regulados, a su vez, por diferentes vías de señalización mediadas por factores tróficos, tales como, citoquinas, glucocorticoides, miostatina (perteneciente a la familia TGF β), y el estrés

oxidativo. Todas ellas convergen en la activación de los factores de transcripción pertenecientes a la familia FoxO (Forkhead box O): FoxO1, FoxO3, FoxO4 y FoxO6 en mamíferos.

El sistema ubiquitin-proteasoma se encarga de degradar proteínas para su uso como combustible. Las proteínas que son degradadas para el mantenimiento homeostático de la célula, son aquellas que están mal plegadas y, en función de la actividad muscular, proteínas sarcoméricas. Este mecanismo se basa en la conjugación de la ubiquitina a proteínas musculares, cuya actividad es dependiente del ATP proteasómico, y con la subsiguiente descomposición de proteínas en aminoácidos. Existen unas enzimas que regulan la actividad de este sistema: enzimas conjugadoras de ubiquitina (E1 y E2), y ligasas de ubiquitina-proteína (E3) (Lecker, Goldberg and Mitch, 2006) **(figura 15)**.

Diferentes pares de ligasas E2-E3 degradan diferentes proteínas. La especificidad para ciertos grupos de proteínas proporciona una selectividad a este proceso de degradación. Asimismo, la expresión de E2 y E3 varía entre los tipos de tejidos según las condiciones fisiológicas. Las ligasas asociadas al músculo y a la atrofia son la Atrogina-1 (conocida también como MAFbx/Fbxo32) y MurF-1 (Leal and Gomes, 2015). Es importante remarcar que el factor de transcripción miogenina, que activa la fusión de miocitos a miotubos (Ganassi *et al.*, 2018), es primordial para activar la expresión de Atrogina-1 y Murf-1 durante la denervación (Moresi *et al.*, 2010). Este hecho indica que la miogenina desempeña un doble papel como regulador del desarrollo muscular y como inductor de atrofia neurogénica. Se ha visto que ratones deficientes en Atrogina-1 y Murf-1 son resistentes a la atrofia inducida por la denervación (Bodine *et al.*, 2001). Por otra parte, la Atrogina-1 degrada el factor de transcripción MyoD, promotor de la miogénesis, y la proteína eIF3f, un importante activador de la síntesis proteica mediada por mTOR (Tintignac *et al.*, 2005; Csibi *et al.*, 2010). Por el contrario, MuRF-1 regula proteínas estructurales musculares importantes, incluidas la Troponina I y las cadenas pesadas de miosina, entre otras (Clarke *et al.*, 2007). Existe otra ligasa de la familia E3, más recientemente

descubierta, la enzima Fbxo40 que regula la señalización anabólica, mediando la degradación del efector de la señalización de la insulina, IRS-1. De hecho, la inhibición de esta enzima por medio de un ARN de interferencia (ARNi) produce hipertrofia en miotubos, mientras que el ratón *knock out*, presenta grandes fibras musculares (Shi *et al.*, 2011). Por otra parte, la inhibición en el músculo de Trim32, otra ligasa tipo E3 relacionada con la miopatía pura LGMD2H (Servián-Morilla *et al.*, 2019), aumenta la señalización de PI3K-Akt, mejora la captación de glucosa e induce el crecimiento de la fibra, mientras que su activación reduce la señalización de PI3K-Akt, disminuye la captación de glucosa y causa atrofia (Cohen *et al.*, 2014).

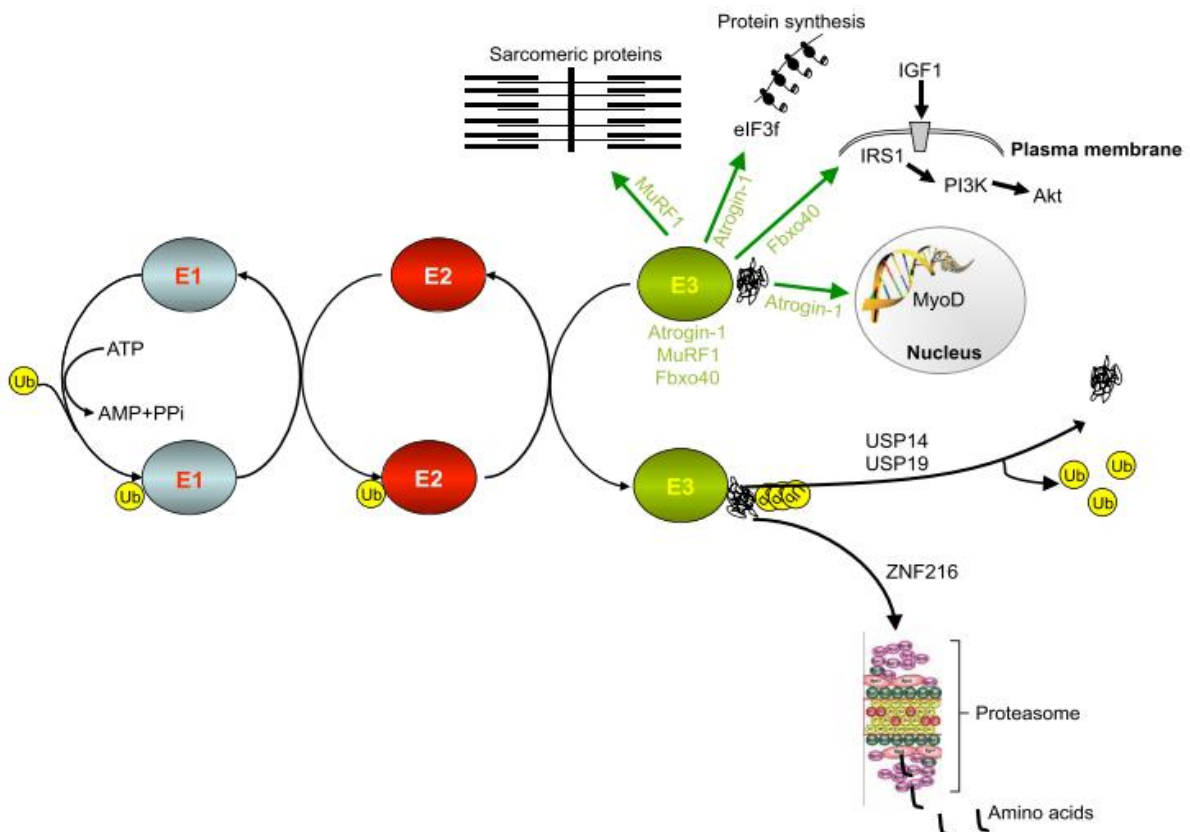


Figura 15. El sistema ubiquitin proteasoma en el músculo. Modificada de Bonaldo and Sandri, 2013.

2.3. Afectación del músculo esquelético en la ELA

Clásicamente, se ha interpretado que la atrofia (amiotrofia) en la ELA es el producto de la denervación de las fibras musculares con las secuelas de pérdida de actividad y de trofismo neuronal, así como de la caquexia producida por las dificultades para la nutrición en estadios avanzados de la enfermedad. Sin embargo, existen numerosas evidencias de que en la ELA, el músculo esquelético puede estar afectado de forma independiente a la denervación motora. La hipótesis de que la atrofia muscular en la ELA podría ser un evento de la patología propia y primaria del músculo, asociada a la inducida por denervación, es conocida como hipótesis "dying-back" que postula que, eventos primarios en el músculo esquelético serían causa primaria desencadenante de la afectación de la neurona motora, a través de una forma de denervación retrógrada (Peggion *et al.*, 2017). En apoyo de esta hipótesis, además de los datos epidemiológicos y experimentales, recientemente se ha demostrado que el suministro de factores de crecimiento directamente al músculo esquelético, podría restaurar la función motora en un modelo de rata de ELA familiar (Suzuki and Svendsen, 2016).

Un hecho característico de la patología de la ELA a nivel muscular además de la atrofia muscular, es el cambio de tipo de fibra. Hay un cambio de fibra rápida de tipo IIB glucolítica a fibra lenta de tipo I, oxidativa que se observa tanto en modelos animales como en pacientes (Peggion *et al.*, 2017).

En los modelos murinos de ELA, se observa en fase presintomática una denervación precoz en las fibras más rápidas vulnerables a la fatiga de tipo IIB (Pun *et al.*, 2006; Hegedus, Putman and Gordon, 2009). Además, a diferencia de lo que ocurre en procesos denervativos por afectación del nervio periférico, en las enfermedades propias de motoneurona, como la ELA o la Atrofia Muscular Espinal, se pueden ver diferentes tipos de fibras en un mismo grupo muscular atrófico, quizás como mecanismo de compensación para mantener la homeostasis de las fibras (Ben Hamida *et*

al., 1994; Baloh *et al.*, 2007; Jensen *et al.*, 2016) (**figura 16**). En estas biopsias musculares de pacientes se han podido identificar dos isoformas de la cadena pesada de la miosina que se corresponden a las cadenas de los tipos de fibra I y IIB simultáneamente, dando lugar a fibras mixtas.

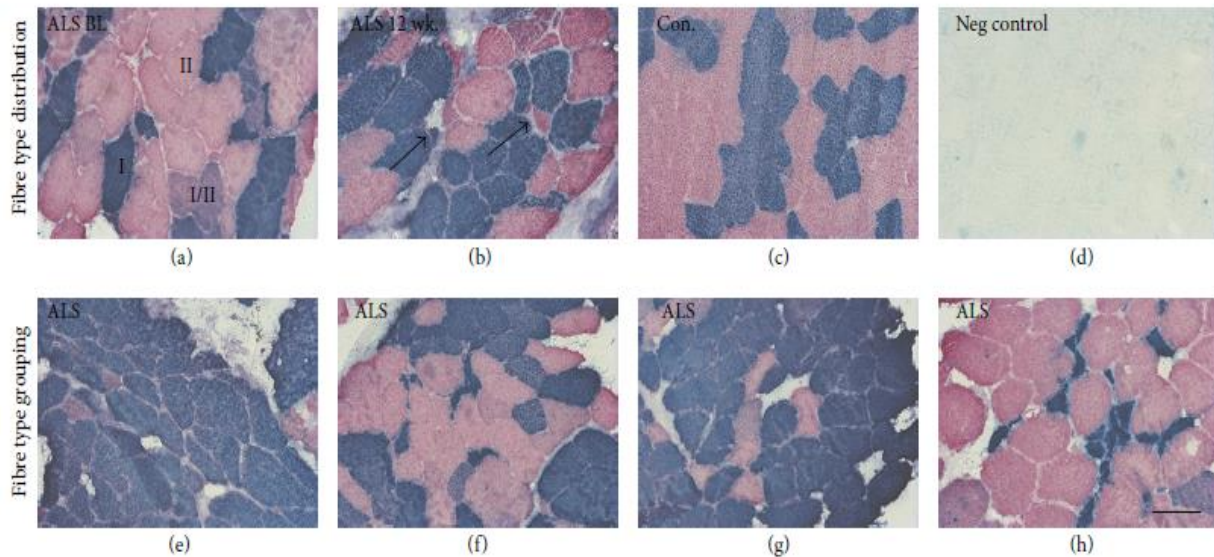


Figura 16. Músculo esquelético de pacientes con ELA; a y b, fibras mixtas, coexistencia de diferentes fibras en un mismo fascículo y diferencia de tamaño de las fibras en ELA (flechas); c, mismo tamaño de fibra en controles; e-h, cambio de tipo de fibra de tipo II a tipo I en ELA. Modificada de Jensen *et al.*, 2016.

Cabe destacar que los músculos extraoculares podrían quedar protegidos en la condición debido a que están compuestos, mayoritariamente, de fibras lentas de tipo I, resistentes a la fatiga, que son inervadas por múltiples motoneuronas para llevar un control más fino del movimiento. De hecho, existe un patrón de afectación especular: en las miopatías de origen mitocondrial se afecta preferentemente esta musculatura (Síndrome de Kearns-Sayre), mientras que en la ELA está preservada de manera específica. La inervación múltiple y el tipo de fibra lenta podrían constituir los elementos protectores de su afectación (Cohen and Caroscio, 1983; Kjellgren *et al.*, 2003) y proporciona alguna pista sobre el tipo de metabolismo que sería más vulnerable en esta enfermedad. Además, existe un patrón de expresión genética diferente entre los músculos oculomotores y de las extremidades. Atendiendo al metabolismo energético y en condiciones fisiológicas, en las fibras oculomotoras y con respecto a las

fibras de tipo IIB, hay una disminución en la expresión de enzimas que participan en el metabolismo catabólico del glucógeno (varias fosforilasas quinasas) y de la glucosa, entre ellos, la GPD1, que participa en la lanzadera de glicerol regenerando el NAD⁺ citosólico. Esto indica que las necesidades energéticas de las fibras oculomotoras no son suplidas, mayoritariamente, por el metabolismo del glucógeno ni por la glucólisis anaerobia (Porter *et al.*, 2001).

Para ahondar en el tipo de metabolismo implicado en la disfunción muscular en la ELA, se han estudiado los modelos animales de la entidad. Así en el modelo mutante de SOD1^{G93A} se ha encontrado un aumento del estrés oxidativo en el músculo incluso antes de la aparición de los síntomas motores. Esta acumulación de especies reactivas de O₂ podría ser debida a un aumento del metabolismo oxidativo, proveniente de un cambio del metabolismo de la fibra y responsable de la disfunción mitocondrial observadas en este modelo (Capitanio *et al.*, 2012; Palamiuc *et al.*, 2015). Dupuis y colaboradores demostraron, en el modelo mutante de SOD1, que la sobreexpresión de UCP1 (*Uncoupled Protein 1*), proteína que desacopla la síntesis de ATP y el gradiente eletroquímico de la mitocondria, generaba un progresivo deterioro de la unión neuromuscular (área rica en mitocondrias) y un aumento significativo en la denervación (Dupuis *et al.*, 2009). Se han llevado a cabo varios estudios en los que han expresado las mutaciones G93A y G37R de SOD1, exclusivamente en músculo esquelético del ratón. Estos ratones desarrollaron fenotipos compatibles con la ELA: debilidad muscular, déficits motores y degeneración de MN (Wong and Martin, 2010). Igualmente, se demostró que los eventos degenerativos en estos modelos, iban precedidos de cambios metabólicos en el músculo basados en la preferencia de uso de lípidos como combustible metabólico (Dobrowolny *et al.*, 2018).

Otra evidencia importante que favorecería esta implicación precoz del músculo en la patogenia de la ELA, procede de un estudio realizado en 57 pacientes, 10 de ellos con formas familiares y 47 con formas esporádicas. Se observaron agregados citoplasmáticos positivos para TDP-43 fosforilada y la

proteína p62, sobre todo en el músculo axial diafragmático (Cykowski *et al.*, 2018). Por otro lado, Vogler y colaboradores han demostrado que TDP-43 es una proteína esencial para el desarrollo y la diferenciación muscular tras observar, tanto en humano como en ratón, unos agregados fisiológicos llamados miogranulos que se unen a los ARNm que codifican proteínas sarcoméricas y cuyo aclaramiento podría estar alterado en la ELA (Vogler *et al.*, 2018).

Con respecto al programa miogénico, aunque existen otras corrientes de pensamiento opuestas a esta idea, se ha observado tanto en modelos animales como en pacientes con ELA, una menor capacidad proliferativa, morfología senescente e incapacidad de diferenciación de las células satélite responsables de la regeneración del músculo, (Pradat *et al.*, 2011; Zalewska *et al.*, 2012; Manzano *et al.*, 2013; Scaramozza *et al.*, 2014; Tsitkanou, Della Gatta and Russell, 2016). Como estas células no reciben información neuronal motora directa, dicha disfunción miogénica podrían dar testimonio, al menos en parte, de una patología muscular intrínseca en la ELA.

Aunque la idea de que la ELA no es una enfermedad restringida sólo al sistema nervioso, sino que afecta a otros sistemas del organismo, no es nueva, no hay demasiados estudios consagrados a esta cuestión. Esta nueva visión de la ELA, como enfermedad metabólica, combinada con otras evidencias que sugieren una participación del tejido muscular en fases iniciales de la enfermedad, avala el interés de analizar en detalle los cambios metabólicos acontecidos en el músculo como consecuencia de la pérdida de homeostasis energética. En este sentido, existen evidencias en las que algunos síntomas característicos de la ELA, como las fasciculaciones, atrofia muscular y caquexia, aparecen antes que la pérdida de las neuronas motoras (Marcuzzo *et al.*, 2011; Dadon-Nachum, Melamed and Offen, 2011). La cuestión a resolver estaría en explicar cómo la afectación muscular sería capaz de inducir de forma retrógrada la neurodegeneración de las motoneuronas inferiores y desde éstas, a la primera motoneurona. Parece también evidente que este mecanismo

bottom-up no sería único y podría convivir con otros mecanismos *top-down* para explicar los diferentes tipos de ELA. Al margen de los mecanismos de inicio de la enfermedad, se ha de explicar cómo se propaga la proteinopatía de una célula a otra (Liu-Yesucevitz *et al.*, 2010; Jucker and Walker, 2013; Ayers *et al.*, 2016; Ravits and La Spada, 2009). Para explicar esta propagación, se han invocado, en base a diferentes similitudes neuropatológicas, un mecanismo prionoide común a otras enfermedades neurodegenerativas que incluyen, como eventos patogénicos, pérdida neuronal, acumulación de agregados proteicos, gliosis y atrofia cerebral (Prusiner, 2001). De acuerdo a esta teoría, en el caso de la ELA, entre las proteínas capaces de formar estas fibrillas se encuentran, TDP43, FUS y SOD1 (Chattopadhyay *et al.*, 2008; Münch and Bertolotti, 2010; Chen *et al.*, 2010; Saini and Chauhan, 2011; Wang *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013; Falconi, Iacovelli and Desideri, 2013; Mompeán *et al.*, 2014; Ivanova *et al.*, 2014; Murakami *et al.*, 2015; Lang *et al.*, 2015; McAlary, Aquilina and Yerbury, 2016; Murray *et al.*, 2017; Gao *et al.*, 2018, 2019; Luo *et al.*, 2018; Cao *et al.*, 2019). El proceso de plegamiento anormal de estas proteínas induciría su acúmulo en el tipo celular vulnerable y la propagación posterior de este cambio estructural, en la misma proteína o en otras, a lo largo del SNC (McAlary *et al.*, 2019).

Numerosas mutaciones del gen que codifica a TDP-43, algunas del gen que codifica para FUS y de genes que codifican ribonucleoproteínas relacionadas con la ELA, se encuentran en regiones conocidas como *prion like domains*, proclives a la agregación citoplasmática (Dormann y Haass, 2011). Además de los cambios estructurales derivados de una especial configuración genética, existen causas ambientales locales capaces de inducir un fenómeno de plegamiento anormal; entre ellas, un estrés oxidativo y metabólico persistente (Prasad *et al.*, 2019). Una vez formados los agregados de estas ribonucleoproteínas, podrían inducir consecutivamente la agregación de la fracción soluble de otras proteínas transmitiéndose “aguas arriba” a la segunda y primera motoneurona. Asimismo, la formación de los agregados celulares está facilitada por el

continuo transporte de estas ribonucleoproteínas solubles desde el núcleo al citoplasma y conlleva una pérdida de proteína en el núcleo, en donde debería ejercer su función fisiológica y cuya deslocalización sería responsable de la muerte neuronal (Boeynaems *et al.*, 2016). Los mecanismos por los cuales los agregados de proteínas pueden transferirse entre las células, de una manera priónica, podrían ser: salida de oligómeros solubles desde la célula dadora y entrada por difusión o endocitosis mediada por receptor a la célula receptora, entrada de agregados insolubles a la célula receptora por micropinocitosis, transporte a la célula receptora por exosomas o microvesículas y transmisión sináptica axón-dendrita de monómeros mal plegados u oligómeros solubles (McAlary *et al.*, 2019).

Todos estos antecedentes podrían sugerir un modelo patogénico basado en que defectos metabólicos primarios y precoces del músculo podrían desestabilizar las terminales nerviosas motoras en la unión neuromuscular y contribuir, de manera retrógrada, a la denervación. Sin embargo, existiendo numerosas pruebas tanto epidemiológicas, como clínicas y experimentales, que avalan un posible papel primario del músculo en la patogenia de la ELA, hasta la fecha, no se conocen cuáles son las vías metabólicas implicadas que generan esta disfunción muscular, ni cómo podría ocasionar la degeneración de la motoneurona y su extensión por el SNC.

Hipótesis

El mecanismo subyacente a la atrofia muscular de los pacientes con ELA, podría tener un componente independiente de la degeneración neuronal y ser secundario a un defecto de la homeostasis energética de la fibra muscular por insuficiente producción de energía, o secundario a un exceso de demanda energética.

Este defecto conduciría, por un mecanismo compensador, a un estado de hipercatabolismo sistémico que cursaría con un incremento de la degradación de proteínas musculares y alteraciones en el proceso de diferenciación de las células precursoras musculares, generando un proceso de atrofia primaria del músculo y eventualmente consecuencias retrógradas sobre la propia motoneurona.

La pérdida de función de los genes causativos de ELA familiar podría ser causa de alteraciones metabólico-energéticas que provocarían la activación secundaria de fenómenos proatróficos y la alteración del proceso de regeneración-diferenciación de la célula muscular.

La disección de los mecanismos moleculares que vinculan la pérdida de función de genes causativos de ELA con las deficiencias metabólicas, en células musculares, podría generar un conocimiento fundamental de dianas putativas sobre las que actuar, para frenar o revertir los eventos de degradación proteica y los eventos moleculares proatróficos en la ELA.

Actuando sobre dichas dianas, los tratamientos dirigidos a rescatar el fenotipo metabólico, podría mejorar la funcionalidad muscular a través de la recuperación del proceso de diferenciación celular, y constituir por ello, una nueva estrategia terapéutica contra la ELA.

Objetivos

1. Determinar el sustrato metabólico-energético del proceso de diferenciación celular en un modelo *in vitro* de mioblastos humanos normales en condiciones basales

1.1. Examinar la evolución del metabolismo energético a lo largo del proceso de diferenciación celular muscular en condiciones fisiológicas

1.2. Identificar las dianas implicadas en la diferenciación celular y analizar los efectos fenotípicos de su modulación farmacológica

1.3. Determinar la relación entre la regulación metabólico-energética de la diferenciación celular y la función de dichas dianas

2. Estudiar el papel regulatorio del metabolismo energético de genes *TARDBP*, *SOD1* y *FUS* en un modelo de mioblastos humanos en cultivo, independiente del soporte neuronal

2.1. Definir los cambios de localización y expresión celular de las proteínas TDP-43, SOD1 y FUS durante la diferenciación del mioblasto humano en condiciones fisiológicas

2.2. Examinar el papel de los genes *TARDBP*, *SOD1* Y *FUS* en el proceso de diferenciación muscular y su participación en las rutas metabólicas vinculadas a la atrofia muscular

2.3. Analizar los efectos fenotípicos que la pérdida de función de dichos genes ocasiona en la diferenciación celular y su relación con el metabolismo energético muscular

2.4. Identificar las alteraciones metabólicas derivadas de la pérdida de función de dichos genes y los mecanismos moleculares que regulan esas alteraciones

3. Estudiar el proceso de diferenciación celular y el metabolismo energético en mioblastos primarios de pacientes representativos de las formas esporádica y familiar de la ELA

3.1. Identificar potenciales dianas cuya modulación farmacológica restablezca las alteraciones fenotípicas, tanto miogénicas como metabólicas, encontradas en los mioblastos silenciados y en los mioblastos de pacientes con ELA

3.2. Seleccionar compuestos químicos susceptibles de convertirse en drogas terapéuticas *de novo* o mediante reposicionamiento, que sean capaces de restaurar el fenotipo metabólico y miogénico, tanto en los mioblastos humanos silenciados como en los mioblastos de pacientes

3.3. Identificar y cuantificar en los pacientes con ELA potenciales trastornos metabólico-energéticos en la función muscular que den soporte a las hipótesis previas, de cara a planificar un posible ensayo terapéutico

Material y métodos

1. CULTIVOS CELULARES

1.1. Línea 8220 de mioblastos *wild type*

La línea celular de mioblastos humanos inmortalizados fue proporcionada por el Dr. Vincent Mouly y generada en la Plataforma para la Inmortalización de Células Humanas, en el Instituto de Myología de París (Francia). El medio de proliferación consistió en el *Skeletal Growth Medium* (SGM) de Promocell suplementado con 10% de FBS, 1% de Glutamax y 1% de gentamicina (ambos de Gibco-Invitrogen). A pesar de que la mayoría de los experimentos se han realizado sin medio de diferenciación, en los experimentos en los que sí se usó el medio básico de diferenciación, se utilizó DMEM (Gibco-Invitrogen), insulina 10 mg/ml, transferrina humana 100 mg/ml y gentamicina 50 mg/ml.

1.2. Silenciamiento de *TARDBP*, *FUS* y *SOD1*

El silenciamiento de los genes se llevó a cabo mediante la infección con partículas lentivirales que contenían ARN de horquilla, *short hairpin RNA* (shRNA). Los plásmidos utilizados para crear esas partículas fueron: SHC001 (shRNA *Empty Vector Control Plasmid DNA*), TRCN000016038 (humano, *TARDBP MISSION shRNA*), TRCN0000288639 (humano, *FUS MISSION shRNA*) y TRCN0000018344 (humano, *SOD1 MISSION shRNA*), TRCN0000010333 (humano, *FOXO MISSION shRNA*) (MISSION® pLKO.1-puro, Sigma-Aldrich). Las partículas virales fueron producidas y tituladas por el Servicio Unidad de vectores virales del CNIC (Madrid).

Cuando los mioblastos 8220 se encontraron a confluencia 50%, se añadieron las partículas virales con una MOI (*Multiplicity of Infection*), multiplicidad de infección, de 10 partículas lentivirales para cada célula. Tras 24 horas se retiró el medio donde se encontraban las partículas y se sustituyó por el medio de proliferación SGM fresco. Para verificar el grado de silenciamiento se midieron las proteínas TDP-43, SOD1 y FUS mediante Western Blot.

1.3. Caracterización de la ultraestructura de las células silenciadas mediante microscopía óptica y electrónica de transmisión (MET)

Las imágenes de microscopía óptica se obtuvieron a través de la cámara digital D90 (Nikon) acoplada al microscopio óptico Eclipse TS100 (Nikon). Tras fijar con glutaraldehído al 3.5%, los cultivos celulares fueron lavados con PBS a 0.1M (pH 7.4) y tratados con tetraóxido de osmio al 2% en PBS a 0.1M (pH7.4), durante 2 horas a temperatura ambiente. Las muestras fueron enjuagadas y deshidratadas con etanol y teñidas con acetato de uranilo al 2%. Los cultivos celulares deshidratados fueron embebidos en araldita (Fluka). Se realizaron secciones semifinas (1.5 μm de grosor) con una cuchilla de diamante y fueron teñidas con una solución de Azul de toluidina al 1% (Sigma-Aldrich). Finalmente, 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). Colaboración con el Servicio de Microscopía Electrónica de la **Universitat de València (UV)**.

1.4. 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 O_2 . Los radicales oxidan el DHE y éste emite entonces una fluorescencia roja. Las células fueron centrifugadas y el *pellet* resuspendido en 0.2 ml de DPBS en un tubo eppendorf, con una concentración final de DHE de 3.2 μM y glucosa 5M. La mezcla fue incubada a oscuras 15 min en un baño de agua a 37°. Entonces la suspensión de células fue transferida a un falcon FACS y analizado en el citómetro Gauva EasyCyte 8HT (Millipore). Colaboración con el grupo **Enfermedades Neuromusculares-Mitocondriales** del Instituto Biodonsotia.

1.5. Cultivo de mioblastos primarios a partir de biopsias musculares

Las biopsias musculares se tomaron mediante la técnica de cielo abierto, se transportaron en medio de acondicionamiento y se lavaron en medio HBSS-Ca/Mg-PSF 1%, eliminando los capilares y el tejido adiposo. Las biopsias lavadas se cortaron en fragmentos y se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ durante toda la noche. Al día siguiente, los fragmentos de músculo se congelaron en nitrógeno líquido sumergidos en medio de congelación. La descongelación se llevó a cabo sumergiendo la parte inferior del criotubo en un baño que estaba a 37°C y los fragmentos de músculo se lavaron en medio HBSS-Ca/Mg-PSF 1%. Se cortaron en fragmentos más pequeños en medio de acondicionamiento. Éstos se sumergieron en medio de acondicionamiento mezclado con suero humano al 25% durante 15-30 minutos para que coagulasen (a esto se le denomina *clot*). En ese momento se cultivaron en una incubadora a 37°C, con 5% de CO₂ durante 4-5 días. Después de esta larga incubación los fragmentos de músculo se lavaron en medio HBSSCa/Mg-PSF 1% y se cortaron en fragmentos aún más pequeños (1 mm aproximadamente). Después de esparcir una gota de la mezcla gelatina/plasma en la superficie de una placa p35, los fragmentos de músculo o explantes se colocaron encima (5 fragmentos/p35). Se añadieron unas gotas de medio de proliferación entre los fragmentos de músculo para mantener la humedad y se incubaron a 37°C durante 30 minutos, para que los fragmentos se adhiriesen a la placa. Después se añadió más medio de proliferación y las células se cultivaron en una incubadora a 37°C, con 5% de CO₂ y una atmósfera humificada durante 5-7 días (el medio se cambió dos veces por semana).

Tras este tiempo, una vez se observó crecimiento de células desde los explantes, éstos se pasaron a placas nuevas para volver a cultivarlos, y las células se tripsinizaron con tripsina al 0,25%. Las células tripsinizadas se centrifugaron a 1.500 rpm durante 10 minutos. Después de desechar el sobrenadante y resuspender el *pellet* en tampón de separación AutoMACS,

las células se volvieron a centrifugar a 1.500 rpm durante 10 minutos. Después de desechar el sobrenadante, el *pellet* se mezcló con 80 µl de tampón de separación AutoMACS y se añadieron 20 µl de bolitas magnéticas CD56+. La mezcla se incubó a 4°C durante 15 minutos y posteriormente se lavó con tampón de separación AutoMACS y se centrifugó a 1.500 rpm durante 10 minutos. Tras desechar el sobrenadante el *pellet* se volvió a lavar con tampón de separación AutoMACS. En este punto se llevó a cabo la selección de células CD56+. Para ello, se colocó una columna LS en el imán y se lavó con 3 ml de tampón de separación AutoMACS.

Después se añadió la muestra a la columna y posteriormente la columna se lavó con otros 3 ml de tampón de separación AutoMACS 3 veces. Como los mioblastos expresan CD56, se quedan adheridos a la columna, por lo tanto, en cuanto todo el tampón de separación AutoMACS pasó por la columna, ésta se soltó del imán y tras añadir 5 ml de tampón de separación AutoMACS, se utilizó la jeringa para soltar las células CD56+ (mioblastos) de la columna y recogerlas. Las células se centrifugaron a 1.500 rpm durante 10 minutos y tras desechar el sobrenadante el *pellet* se resuspendió en medio de proliferación. Los mioblastos se cultivaron a la densidad deseada en placas en una incubadora a 37°C, con 5% de CO₂ y una atmósfera humificada. El medio de proliferación usado fue el SGM; el mismo medio utilizado para los mioblastos inmortalizados.

La codificación de las biopsias utilizadas fueron las siguientes:

- ✓ Biopsia 1. Muestra "control": varón de 45 años (nacido el 28/8/1974)- biopsia 7/2/2019, gastrocnemio izquierdo.
- ✓ Biopsia 2. Muestra "ELA esporádica": mujer de 66 años (nacida el 30/8/1953)- biopsia 5/7/2019, bíceps derecho.

Biopsia 3. Muestra "ELA familiar": varón de 45 años (nacido el 19/8/1974)- biopsia 8/8/2019, tibial anterior izquierdo.

Colaboración con el grupo de **Distrofia de cinturas LGM2A** del Instituto Biodonostia

2. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

2.1. Extracción de proteínas de los cultivos celulares inmortalizados y primarios

La extracción de proteínas se hizo con *sample buffer* conteniente de Tris 0,062 M (pH 7.5), glicerol 5%, SDS 2%, azul de bromofenol 5mg/ml y β -mercaptoetanol al 5%. Tras calentar el *sample buffer* a 100° durante 5 minutos se añadió 100 μ l a 300000 células, se resuspendió y se llevó a ebullición 5 min. Posteriormente, se guardó a -20°C para la lisis de las membranas plasmáticas.

Fraccionamiento celular

Tras obtener el *pellet* de células, tanto de los mioblastos inmortalizados como de los mioblastos primarios, se utilizó el *kit* de fraccionamiento celular *Thermo Scientific NE-PER* (Código de catálogo 78833), para separar tanto la fracción proteica citoplasmática como la nuclear.

2.2. Western blot

Se utilizó la técnica de Western blot para detectar proteínas específicas en lisados celulares mediante electroforesis en gel. Utilizamos el método SDS-PAGE que permite la separación de proteínas por peso molecular en geles de poliacrilamida. El dodecilsulfato (SDS) desnaturaliza las proteínas y les confiere una carga negativa, por lo que pueden pasar al electrodo positivo a través de la malla del gel de acrilamida. Las proteínas más pequeñas migran más rápido, mientras que las más grandes son más lentas y necesitan concentraciones más bajas de poliacrilamida para separarse. Los extractos de proteínas totales se introdujeron en geles prefabricados SDS-PAGE en gradiente 4-20% de poliacrilamida (Mini-PROTEAN® TGXTM Bio-Rad), lo que nos permitió separar proteínas desde 15 kDa hasta 500 kDa. Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF, previamente activadas con metanol, mediante electroblotting y se bloquearon durante 1 hora con una disolución

de leche descremada al 5% en TBS-tween (*tris buffered saline*). Después de eso, las membranas se incubaron durante la noche a 4 ° C con anticuerpos primarios (**tabla 1**) diluidos en TBS-tween con 2% de suero de caballo, 5% de BSA y 0.02% de azida sódica. Al día siguiente, las membranas se incubaron con anticuerpos secundarios de burro conjugados con fluoróforos tipo Alexa fluor plus (488 donkey anti-rabbit IgG (H+L) (A32790), 488 donkey anti-mouse IgG (H+L) (A32766), 647 donkey anti-rabbit IgG (H+L) (A32795), 647 donkey anti-mouse IgG (H+L) (A32787) de Invitrogen. El revelado fue realizado mediante análisis de fluorescencia emitida por el aparato *iBright FL1000 Imaging System* y cuantificado con el software *Image Studio Lite* (Ver 5.2).

Nombre	Dilución	Hospedador	P.M	Compañía	Especies	Clonalidad	Ref
BRP44L(MPC1)	1:100-1:500	Rb	13	Novus	H	Policlonal	NBP1-91706
BRP44L(MPC1)	1:100-1:250	Rb	13	Sigma-Aldrich	H	Policlonal	HPA045119
TOMM20	1-5ug/mL [0.5mg/mL]	Ms	16	Abcam	H, Rat	Monoclonal	ab56783
TOMM20	1:1000	Rb	16	Cell Signaling	H, Ms, Rat	Monoclonal	#42406
Myogenin	1:250	Ms	40	Abcam	H, Ms, Rat, Pig	Monoclonal	ab1835
Fbx32	1:1000-1:2000	Rb	42	Abcam	H, Ms, Rat	Monoclonal	ab168372
Fbx32 (Atrogin1)	1-3ug/mL	Goat	42	Abcam	H, Ms	Policlonal	ab92281
MuRF1 (C-terminal region)	1:1000	Rb	30	ECM Biosciences	H, Ms, Rat	Policlonal	# MP3401
Anti-SLC25A11	1:1000-1:10.000	Rb	34	Abcam	H, Ms, Rat	Policlonal	ab155196
UCP2	1:1000	Rb	32	Cell Signaling	H, Ms, Rat	Monoclonal	#89326
PKM	1:100-1:1000	Ms	58	Santa Cruz	H, Ms, Rat	Monoclonal	sc-365684
HXX II	1:100-1:1000	Ms	100	Santa Cruz	H	Monoclonal	sc-374091
SOD1	1-2 µg/mL	Ms	16	Invitrogen	H,Ms	Monoclonal	MA1-105
TDP-43	1/5000	Ms	43	Abcam	H, Ms, Rat	Monoclonal	ab104223
TDP-43 (G400)	1:1000	Rb	45	Cell Signaling	H, Ms, Rat	Policlonal	#3448
FUS/TLS	0.4 µg/mL	Rb	70	Invitrogen	H, Ms, Rat	Policlonal	PA5-52610
Aralar/AGC1	1:1000	Rb	75	Cell Signaling	H, Ms, Rat	Monoclonal	#64169
Fox03	1:100-1:1000	Rb	82-97	Thermo Fisher	H, Ms	Monoclonal	PA5-27145
PFKFB3	1:1000	Rb	60	Cell Signaling	H, Ms, Rat	Monoclonal	#13123
UCP2	1:1000	Rb	32	Cell Signaling	H, Ms, Rat	Monoclonal	#89326
β-Tubulin	1:2000-1:5000	Ms	55	Invitrogen	H, Ms, Rat, ...	Monoclonal	MA5-16308
ME1	1:500-1:3000	Rb	64	Invitrogen	H, Ms, Rat	Policlonal	PA5-21550
PFK1	1:500-1:3000	Rb	85	Invitrogen	H, Ms	Policlonal	PA5-29336
ME2	1-2ug/mL [1mg/mL]	Rb	65	Invitrogen	H	Policlonal	PA5-38007
GOT2	1:500-1:3000	Rb	40	Invitrogen	H, Ms, Rat	Policlonal	PA5-27572

MDH1	0.4 ug/mL [0.4 ug/uL]	Rb	37	Invitrogen	H, Ms, Rat	Policlonal	PA5-55573
GOT1	1:100-1:250	Rb	46	Invitrogen	H	Policlonal	PA5-67252
SLC25A11	1:1000-1:10000	Rb	34	Invitrogen	H	Policlonal	PA5-27510
SLC25A11	0.2-1ug/mL [0.5mg/mL]	Rb	34	Invitrogen	H, Ms, Rat	Policlonal	PA5-42428
Glutaminase	1:1000-1:10.000	Rb	74	Invitrogen	H, Ms	Policlonal	PA5-40134
GPD1	1:500-1:3000	Rb	37	Invitrogen	H, Ms, Rb	Policlonal	PA5-27971
SLC25A11	1:1000-1:10.000	Rb	34	Abcam	H, Ms,Rat	Policlonal	ab155196
β-Actin	1:100.000	Ms	42	Sigma-Aldrich	H, Ms, Rat	Monoclonal	A5441
MDH2	0.4 ug/mL [0.2 ug/uL]	Rb	37	Sigma-Aldrich	H, Ms, Rat	Policlonal	HPA026720
GPD2	0.4 µg/mL	Rb	74	Invitrogen	H	Policlonal	PA5-61022
MDH2	0.4 µg/mL	Rb	36	Invitrogen	H, Ms, Rat	Policlonal	PA5-82692
FoxO3A	1:500-1:3000	Rb	95	Invitrogen	H, Ms	Policlonal	PA5-27145
FoxO1 (S.502.4)	1:1000	Rb	95	Invitrogen	H,Ms,NonHPrimate,Rat	Monoclonal	MA5-14846
MyoD1 (D8G3) XP	1:1000	Rb	45	Cell Signaling	H	Monoclonal	#13812
PGC1-α	1:1000	Rb	92	Abcam	H, Ms, Rat,Zb	Policlonal	ab54481

Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados para Western blot.

2.3. Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia se usó para analizar la localización intracelular y la distribución de las diferentes proteínas en mioblastos primarios y en mioblastos silenciados. Los mioblastos sobre *cover slips* fueron fijados tras varios lavados en DPBS (Gibco), con paraformaldehído al 4% (PFA) durante 10 min. Tras varios lavados se bloqueó con solución de bloqueo (5% BSA, en TBS-tween con 2% de suero de caballo, 0.02% de azida sódica y 0,5% Triton X-100) durante 30 min. Posteriormente, se realizó la primera incubación con el anticuerpo primario y se dejó *overnight* a 4°. Tras realizar 3 lavados con TBS-tween se llevó a cabo la segunda incubación durante 1h a temperatura ambiente y en oscuridad. En este caso se utilizaron anticuerpos secundarios tipo Alexa fluor Plus (Invitrogen) de burro conjugados con fluoróforos tipo Alexa fluor plus (488 donkey anti-rabbit IgG (H+L) (A32790), 488 donkey anti-mouse IgG (H+L) (A32766), 647 donkey anti-rabbit IgG (H+L) (A32795), 647 donkey anti-mouse IgG (H+L) (A32787), 555 donkey anti-mouse IgG (H+L) (A31570) y 555 donkey anti-mouse IgG (H+L) (A31572). Tras 2 lavados con TBS-tween, 1 lavado con TBS y otro con H₂O destilada, se montaron los cubres con *Prolong Diamond Antifade Mountant con DAPI* (Invitrogen). Finalmente, se visualizaron las células en un microscopio de fluorescencia, un microscopio Nikon 80i y un microscopio epifluorescente invertido (Nikon Ti-S) y las imágenes se obtuvieron con una cámara de alta resolución ORCA Flash 2.8 (Hamamatsu). La cuantificación de núcleos, para calcular el índice de fusión y el análisis de expresión proteica, nuclear y citoplasmática, se llevó a cabo mediante el programa Image J.

Nombre	Dilución	Hospedador	P.M	Compañía	Especies	Clonalidad	Ref
TDP-43	1/50	Ms	43	Abcam	H, Ms, Rat	Monoclonal	ab104223
TDP-43 non p	1:100	Rb	45	Sigma-Aldrich	H, Ms	Policlonal	SAB4200411
FUS/TLS	0.4 µg/mL	Rb	70	Invitrogen	H, Ms, Rat	Policlonal	PA5-52610
Myogenin	1:100	Ms	40	Abcam	H, Ms, Rat, Pig	Monoclonal	ab1835
FoxO3A	1:100	Rb	82-97	Thermo Fisher	H, Ms	Monoclonal	PA5-27145
FoxO1 (S.502.4)	1:1000	Rb	95	Invitrogen	H,Ms,NonHPrimate,Rat	Monoclonal	MA5-14846
MyoD1(D8G3) XP	1:1000	Rb	45	Cell Signaling	H	Monoclonal	#13812
14-3-3	1:100	Ms	28	Invitrogen	H, Ms	Policlonal	MA5-12242
14-3-3	1:100	Rb	28	Invitrogen	B, C.e, H, Ms, Rat, X	Policlonal	#51-0700
MyHC	1:100	Ms	220	Biotechne	H	Monoclonal	IC4470F
PGC1-α	1:1000	Rb	92	Abcam	H, Ms, Rat,Zb	Policlonal	ab54481

Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados para inmunofluorescencia.

3. ANÁLISIS METABOLÓMICO 1H-RMN

3.1. Gestión de las muestras

Las muestras fueron enviadas desde Biodonostia al Laboratorio de Imagen Molecular y Metabolómica de la Facultad de Medicina-UCIM de la Universidad de Valencia, y mantenidas congeladas a una temperatura de -80°C hasta el momento de su preparación para la medida del espectro de RMN.

3.2. Adquisición de los espectros de RMN

Para la preparación de todas las muestras, se ha basado en trabajos previos desarrollados en la misma Unidad de Metabolómica con muestras similares (García-Simon *et al.*, 2015; Marrachelli *et al.*, 2016; García-Villaescusa *et al.*, 2018).

Muestras de extracto de músculo

Una vez descongeladas las muestras, se ha añadido 45 µL de una disolución de ácido trimetilsililpropanoico-d4 (TSP, 0.28 mM) en D₂O 455 µL de extracto de músculo y toda se ha introducido en tubos de 5 mm de alta resolución de RMN. La concentración final del TSP en el tubo de medida fue de 0.025 mM.

Muestras de suero

El método de preparación de muestras de suero consistió en añadir 45 µL de una disolución de ácido trimetilsililpropanoico-d4 (TSP, 27.9 mM) en D₂O en D₂O a 455 µL de suero en tubos de 5 mm de alta resolución de RMN. La concentración final del TSP en el tubo es de 2.5 mM.

Muestras de orina

El método de preparación de muestras de orina consistió en adicionar 55 µL de una solución de KH₂PO₄ (1.5M)/ácido trimetilsililpropanoico-d4 (TSP, 5.8 mM) en D₂O a 495 µL de orina. Un total de 500 µL de la mezcla anterior se

introdujo dentro de un tubo de 5 mm de alta resolución de RMN. La concentración final del TSP en el tubo es de 0.58 mM.

Protocolo de medidas de RMN

Todos los espectros han sido adquiridos en un espectrómetro Bruker Avance III HD 600 (Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten, Alemania) operando a una frecuencia de ^1H de 600,13 MHz equipado con una sonda QXI de 5mm. Para la medida de todas las muestras, se ha empleado una sonda QXI 5mm de cuádruple resonancia $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}/^{31}\text{P}$. La gestión de los tubos de medida, entrada y salida del espectrómetro, se realizó mediante un robot muestreador SampleJet termostaticado a 4°C. La temperatura de la muestra dentro del equipo se controló mediante una unidad enfriadora BCU Xtreme. La uniformidad del campo magnético se consiguió inicialmente mediante un ajuste manual de las bobinas de homogeneidad usando un experimento 1D con presaturación de agua en modo interactivo. Para el resto de las medidas, la homogeneidad de campo se mantiene mediante una rutina de corrección automática (TopShim) implementada en el software del equipo. Para todas las muestras se adquirió un conjunto de distintas secuencias de pulsos (ZG, PRESAT, CPMG corto y largo, NOESYPR1D) que conforman el protocolo más adecuado y empleado en los estudios de metabolómica mediante RMN. La secuencia que empleamos para la cuantificación relativa de los niveles metabólicos ha sido un experimento *spin-echo* simple con presaturación de la señal del disolvente tipo PRESAT.

Extracto de músculo

Se realizaron 128 repeticiones, 16 *dummy scans*, 66000 puntos, con una anchura espectral de 14 ppm y un tiempo total de adquisición de 4s. La temperatura nominal de la muestra durante las medidas se mantuvo constante en 27°C.

La presaturación del agua se aplica durante 1s a lo largo del tiempo de reciclado para la supresión de la señal del solvente. Antes de aplicar la

transformada de Fourier a los datos, se multiplicó la FID (decaimiento libre de la señal) por una función exponencial de anchura de línea de 0,3 Hz.

3.3. Procesado de los espectros

Los espectros se procesaron, previamente al análisis, mediante corrección de fase, ajuste de la línea base y referenciados a la señal del TSP usando el software MestReNova 10 (Mestrelab Research S.L., Santiago de Compostela, España). Los espectros se normalizaron al área espectral alifática total (0.5-4.4 ppm) con el fin de eliminar las diferencias en la concentración total de metabolitos de la muestra. Las resonancias se asignaron de acuerdo a la bibliografía disponible, las bases de datos accesibles (<http://www.hmdb.ca>) y la base de datos espectral incluida en el programa de ajuste Chenomix NMR Suite 8.1 (Chenomx Inc, Alberta, Canadá). Las señales que pertenecen a los metabolitos seleccionados se integraron y cuantificaron utilizando Chenomix NMR Suite 8.1.

Colaboración con el **Laboratorio de Imagen Molecular y Metabólica** (Servicio RMN), dentro de la **Unidad Central de Investigación (UCIM)** y el Servicio de MicroPET/TAC. Facultad de Medicina y Odontología. **Universitat de València**.

4. ANÁLISIS METABOLÓMICO MEDIANTE UPLC-MS

El análisis metabólico fue realizado por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un espectrómetro de masas.

Se analizaron de forma semicuantitativa el ácido aspártico, ácido málico, ácido cítrico, ácido glutámico, glutamina y ácido 2-cetoglutárico en células. Se analizaron un total de 16 *pellets* de células incubadas para determinar los niveles celulares relativos de diferentes metabolitos.

Los sedimentos celulares se homogeneizaron en 500 µl de agua helada / metanol (50/50 v/v) y ¹³CD₃-metionina 1 µM (metionina marcada estable,

metionina SL, como estándar interno) con un homogeneizador de tejidos (FastPrep24) en 1 x 30 ciclos a 6000 rpm. Posteriormente, se transfirieron 400 µl del homogenado a un tubo Eppendorf nuevo y se agitó a 1400 rpm durante 30 minutos a 4 °C. A continuación, los tubos se centrifugaron durante 15' a 13000 rpm a 4 °C. Se transfirieron 100 µl del sobrenadante a un tubo nuevo y se colocaron a -80 °C durante 20'. Los sobrenadantes enfriados se evaporaron con un speedvac en 3 h aproximadamente. Los *pellets* resultantes se resuspendieron en 120 µl de agua/acetonitrilo (MeCN) (40/60 v/v).

Las muestras se midieron con un sistema UPLC (Acquity, Waters Inc., Manchester, Reino Unido) acoplado a un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo (ToF MS, SYNAPT G2, Waters Inc.). Una columna (2.1 x 100 mm) de amida BEH de 1.7 µm (Waters Inc.), termostaticada a 40 ° C, para separar los analitos antes de ingresar al MS. El disolvente A (fase acuosa) consistió en 99.5% de agua, 0.5% de ácido fórmico y 20 mM de formiato de amonio mientras el solvente B (fase orgánica) consistió en 29.5% de agua, 70% de acetonitrilo, 0.5% de ácido fórmico y formiato de amonio 1mM.

Para obtener una buena separación de los analitos se utilizó el siguiente gradiente: de 5% A a 50% A en 2.4 minutos en gradiente curvo (# 8, como lo define Waters), desde 50% A a 99.9% A en 0.2 minutos constante a 99.9% A por 1.2 minutos, nuevamente a 5% A en 0.2 minutos. La velocidad de flujo fue de 0.250 ml/min y el volumen de inyección fue de 2 µL. Todas las muestras se inyectaron al azar. Después de cada 6 inyecciones, se inyectó una muestra de QC.

El MS se hizo funcionar en modo de ionización por electropulverización negativa en exploración completa (50 Da a 1200 Da). El voltaje del cono fue de 25 V y el voltaje capilar fue de 250 V. La temperatura se ajustó a 120 °C y la temperatura capilar a 450 °C. El flujo del cono y el gas de desolvatación, se ajustaron a 5 l/hy 600 l/h, respectivamente. Se infundió 2 ng/ml de solución de leucina-encefalina en agua/acetonitrilo/ácido fórmico (49.9/50/0.1% v/v/v) a 10 µL/min y se usó para una masa de bloqueo que se midió cada 25

segundos por 0.5 segundos. Los picos espectrales se corrigieron automáticamente.

Se obtuvieron trazas de iones extraídos para ácido aspártico ($m/z=132.0297$), ácido glutámico ($m/z=146.0453$), glutamina ($m/z=145.0613$), ácido cítrico ($m/z = 191.0192$), ácido málico ($m/z=133.0137$) y ácido 2-cetoglutarico ($m/z=145.0137$), en una ventana de 20 mDa y posteriormente suavizado (2 puntos, 2 iteraciones) e integrado con el software QuanLynx (Aguas, Manchester). Como se observó una deriva de la señal durante el análisis en muestras de QC, las áreas de pico se corrigieron para la deriva de señal.

Colaboración con el **Laboratorio de Exosomas y plataforma de metabolómica** del Centro de Investigación Cooperativa en Biociencias (**CIC bioGUNE**).

5. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE RNA

5.1. RT-qPCR (Real time quantitative polymerase chain reaction)

El ARN total se extrajo de los homogeneizados de cultivo celular usando el kit MiniRNeasy y el conjunto de ADNasa libre de ARNasa (Qiagen). Después de la cuantificación, se obtuvo ADNc de 1 μ g de ARN usando el kit de síntesis de ADNc SuperScript® Vilo (Thermo Fisher). Finalmente, la reacción qPCR se llevó a cabo en un aparato del Sistema de PCR en tiempo real 7900HT (Applied Biosystems).

Los cDNAs provenían de los mioblastos silenciadas para *TARDBP* (shTDP43), *SOD1* (shSOD1) y *FUS* (shFUS) por separado y el control del método de infección NS-shRNA. Se estudió la expresión de los siguientes genes: *MYOD1*, *PFKM*, *PFKFB3*, *MPC1*, *UCP2*, *UCP3*, *HK2* y *PK*.

Las qPCR se llevaron a cabo con 10 ng de ADNc y 300 nM de cebadores directos e inversos diluidos en la mezcla maestra Power SYBR Green PCR (Thermo Fisher). La cantidad de ADNc se calculó a partir de la curva estándar. Los cebadores directo e indirecto para cada gen fueron

comerciales adquiridos en Sigma-Aldrich: *MYOD1* (NM_002478), *PFKM* (NM_001166687), *PFKFB3* (NM_001145443), *BRP44L* (NM_016098), *UCP2* (NM_003355), *UCP3* (NM_003356), *HK2* (NM_000189) y *PKM2* (NM_002654). Colaboración con el grupo **Distrofia de Duchenne** del Instituto Biodonostia.

5.2. Análisis de expresión genética (mRNA)

El ARN obtenido se analizó utilizando matrices de expresión de transcripción completa GeneChip del tipo humano Clariom D (Affymetrix). Estas matrices analizan más de 540,000 transcripciones y permiten el análisis en dos niveles: el nivel de expresión génica y el nivel de *splicing* alternativo. Las matrices se hibridaron siguiendo los protocolos recomendados, utilizando un horno de hibridación a 45°C 60 rpm durante 16 h. Después de que se completó la hibridación, se realizó un paso de lavado y tinción en GeneChip Fluidics Station 450. La captura de la imagen se realizó en el escáner GeneChip 7G (Affymetrix). El software de análisis utilizado fue Expression Console (Affymetrix), Transcriptome Analysis Console (TAC) 4.0 y Gene Set Enrichment Analysis (GSEA; Broad Institute).

Colaboración con el grupo de **Esclerosis Múltiple** y el grupo de **Enfermedades Neuromusculares mitocondriales** del Instituto de Investigación Biodonostia.

6. ANÁLISIS METABÓLICO DE LAS LÍNEAS CELULARES MEDIANTE SEAHORSE

Las rutas metabólicas se estudiaron utilizando el analizador Seahorse XF96 ExtracellularFlux Analyzer (Agilent). Este equipo permite estudiar de manera simultánea las dos principales vías energéticas, la respiración mitocondrial y la glucólisis, en células vivas y a tiempo real. La mayoría de las células pueden obtener energía de ambas vías, adaptándose así a los cambios en su

entorno. Esta técnica es apta para todo tipo celular (células primarias, líneas celulares, células en suspensión y mitocondrias aisladas entre otros). El analizador mide el *ratio* del consumo de oxígenos (OCR, *Oxygen Consumption Rate*), como indicador de la respiración mitocondrial; y el *ratio* de acidificación extracelular (ECAR, *Extracelular Acidification Rate*), como indicador de la glucólisis y la producción de lactato.

6.1. Estudio de la función mitocondrial

La respiración mitocondrial es una de las principales vías de obtención de energía para la célula. En presencia de oxígeno la célula respira para obtener ATP, consumiendo oxígeno y sustratos como ácidos grasos, glucosa y glutamina. El analizador *Seahorse* cuantifica el O₂ consumido a lo largo del proceso en el que se van añadiendo inhibidores y activadores de las diferentes proteínas de membrana mitocondrial que forman parte también de la cadena respiratoria.

El ensayo de estrés mitocondrial permite obtener la información de diferentes parámetros bioenergéticos, como: la respiración basal, la respiración máxima, la producción de ATP, la capacidad respiratoria de reserva (*spare respiratory capacity*) y la eficacia de acoplamiento (*coupling efficiency*) (**figura 1 y Tabla 3**), todos ellos en función de los cambios de consumo de O₂ al añadir los moduladores enzimáticos.

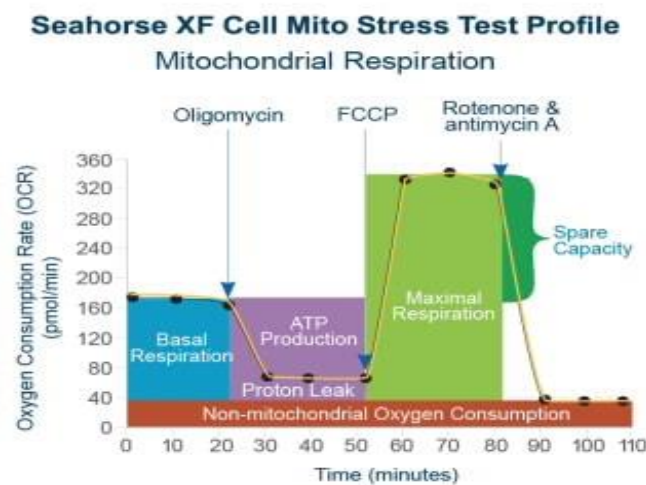


Figura 1: Esquema representativo de los parámetros que pueden obtenerse con el ensayo de estrés mitocondrial.

Para la obtención de los parámetros se realizan 3 inyecciones seriadas al minuto 20, 50 y 80, respectivamente, de los siguientes moduladores: oligomicina, carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP) y rotenona/antimicina (**figura 2**).

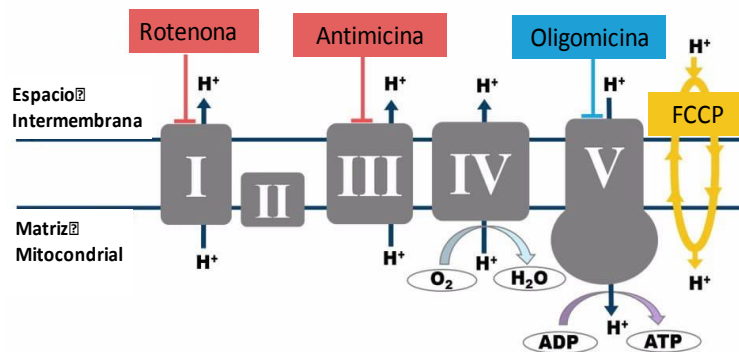


Figura 2: Representación esquemática de los inhibidores utilizados en el ensayo de estrés mitocondrial: Oligomicina, FCCP v Rotenona/Antimicina.

La oligomicina inhibe el complejo V de la cadena respiratoria, la ATP sintasa. Este compuesto disminuye el flujo de electrones de la cadena respiratoria, disminuyendo la respiración mitocondrial o el OCR. Esta disminución del OCR refleja la cantidad de O₂ que se destina a la producción de ATP celular. El FCCP es un agente desacoplante que colapsa el gradiente de protones e interrumpe el potencial de membrana de la mitocondria. Como resultado, el flujo de electrones de la cadena respiratoria se desinhibe y el consumo de oxígeno alcanza su máximo. El aumento del OCR generado por el desacoplante FCCP puede ser utilizado para calcular la capacidad de respiración de reserva definido como la capacidad de la célula para responder a un aumento de la demanda energética o frente al estrés. La combinación de la rotenona, inhibidor del complejo I y la antimicina, inhibidor del complejo III, inactiva la cadena respiratoria y permite el cálculo de la respiración no-mitocondrial. Las concentraciones finales en la placa de cultivo del Seahorse de estos inhibidores fueron las siguientes: oligomicina 1 μM, FCCP 1 μM, rotenona 0,5 μM y antimicina 0,5 μM.

La siembra de células en la placa de cultivo 24 horas antes del ensayo se realizó con 13.000 mioblastos por pocillo tanto para mioblastos silenciados como para mioblastos primarios.

Parameter Value	Equation
Non-mitochondrial Oxygen Consumption	Minimum rate measurement after Rotenone/antimycin A injection
Basal Respiration	(Last rate measurement before first injection) – (Non-Mitochondrial Respiration Rate)
Maximal Respiration	(Maximum rate measurement after FCCP injection) – (Non-Mitochondrial Respiration)
H+ (Proton) Leak	(Minimum rate measurement after Oligomycin injection) – (Non-Mitochondrial Respiration)
ATP Production	(Last rate measurement before Oligomycin injection) – (Minimum rate measurement after Oligomycin injection)
Spare Respiratory Capacity	(Maximal Respiration) – (Basal Respiration)
Spare Respiratory Capacity as a %	(Maximal Respiration) / (Basal Respiration) × 100
Acute Response	(Last rate measurement before oligomycin Injection) – (Last rate measurement before acute injection)
Coupling Efficiency	ATP Production Rate) / (Basal Respiration Rate) × 100

Tabla 3. Definición de los diferentes parámetros de actividad respiratoria mitocondrial en base al consumo de O₂. Tomada de la compañía Agilent.

6.2. Estudio de la función glucolítica

La glucólisis anaerobia es la vía metabólica por la que, a partir de una molécula de glucosa, se generan dos moléculas de piruvato. Este último, en condiciones anaeróbicas, se transforma en lactato en el citoplasma y en condiciones aeróbicas, puede convertirse en Acetil-CoA dentro de la mitocondria.

El instrumento XF mide directamente la tasa de acidificación, y el parámetro que la mide se conoce como ECAR. Para realizar el ensayo, las células se incuban en un medio sin glucosa o piruvato y se mide el ECAR. La primera inyección es una saturación de glucosa (10 mM) que las células catabolizan por la ruta metabólica, generando ATP, NADH, H₂O y protones. La liberación de protones al medio extracelular genera un aumento rápido del ECAR. Esta respuesta, generada por la inyección de la glucosa, ofrece la información de la glucólisis de la muestras en estudio. La inyección de la oligomicina (1 μM) inhibe la producción de ATP en la mitocondria y la producción de la

energía se desplaza hacia la glucólisis, promoviendo así un aumento del ECAR, mostrando la capacidad glucolítica máxima. La última inyección, 2-dg (50 mM), inhibe la glucólisis por la unión competitiva del 2-dg a la hexoquinasa II, enzima que cataliza la primera reacción de la glicólisis. Así, se da una disminución del ECAR, confirmando a su vez que el aumento del ECAR ha sido causa de la glucólisis. La diferencia entre la capacidad glucolítica y la tasa de glucólisis define la reserva glucolítica. El ECAR, antes de la inyección de glucosa, se conoce como acidificación no glucolítica, que está producido por procesos diferentes a la glucólisis en la célula (**figura 3 y Tabla 4**). Las concentraciones finales de los moduladores enzimáticos fueron: glucosa 10mM, oligomicina 1 μ M y 2-dg 50 mM.

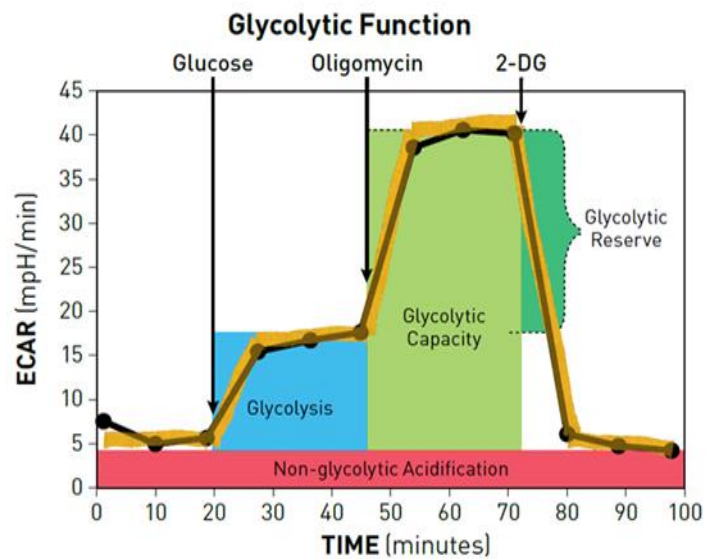
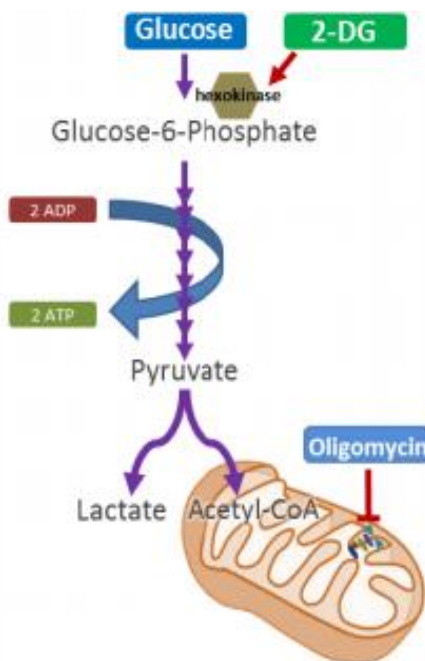


Figura 3: Representación esquemática de la vía metabólica de la glicólisis y los inhibidores utilizados en el ensayo de estrés glicolítico: 2-dg y oligomicina. Tomada de la compañía *Agilent*.

Parameter	Rate Measurement Equation Used by Report Generator
Glycolysis	(Maximum rate measurement before Oligomycin injection) – (Last rate measurement before Glucose injection)
Glycolytic Capacity	(Maximum rate measurement after Oligomycin injection) – (Last rate measurement before Glucose injection)
Glycolytic Reserve	(Glycolytic Capacity) – (Glycolysis)
Glycolytic Reserve as a %	(Glycolytic Capacity Rate) / (Glycolysis) × 100
Non-Glycolytic Acidification	Last rate measurement prior to glucose injection
Acute Response	(Last measurement rate before glucose injection – Last rate measurement before acute injection)

Tabla 4. Definición de los diferentes parámetros de vía glucolítica en base al aumento de acidez del medio extracelular. Tomada de la compañía *Agilent*.

6.3. Estudio del fenotipo energético

El Seahorse XF mide el fenotipo energético celular midiendo la respiración mitocondrial y glucolisis en condiciones basales y condiciones estresadas, para revelar los tres parámetros clave del metabolismo energético de la célula: fenotipo basal, fenotipo estresado y potencial metabólico. El test de medición de fenotipo energético mide el potencial metabólico de células vivas, utilizando oligomicina y FCCP. Con una inyección simultánea de estos compuestos estresantes ocurren dos eventos: la oligomicina inhibe la producción de ATP por las mitocondrias, y provoca un aumento compensatorio en la tasa de glucolisis, a medida que las células intentan satisfacer sus demandas de energía a través del vía glucolítica. El FCCP despolariza la membrana mitocondrial, activando la entrada de protones desde el espacio inermembrana a la matriz mitocondrial, y conduce a tasas de consumo de O₂ más altas en las mitocondrias, con el objeto de restaurar el potencial de membrana mitocondrial. Este test informa sobre la preferencia metabólica de los tipos celulares oxidativas o glucolíticas y la capacidad de respuesta metabólica a los diferentes insultos celulares (**figura 4**).

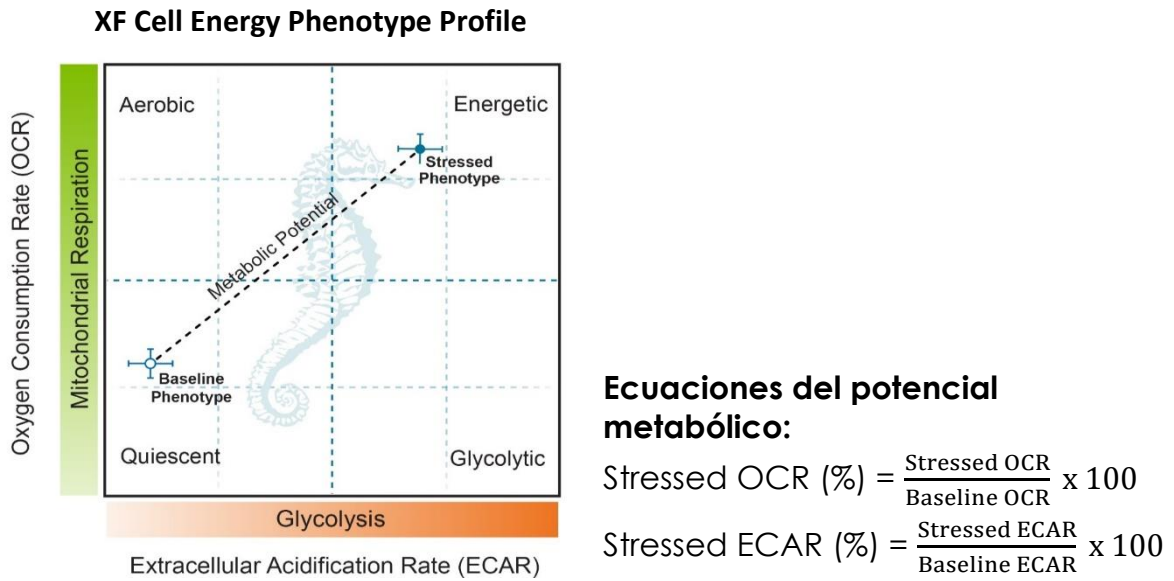


Figura 4. Esquema representativo del test de fenotipo metabólico y las ecuaciones para calcular el potencial metabólico con respecto a las condiciones basales.

6.4. Estudio de la tasa de obtención de ATP

Este ensayo permite medir la producción de ATP mitocondrial y glucolítico simultáneamente a través de una serie de ecuaciones basadas en la medición del consumo de O₂ y la medición del aumento de acidez del medio extracelular, tras la administración al medio de cultivo de moduladores enzimáticos.

Las concentraciones utilizadas de estos moduladores fueron: oligomycin 1 μM, rotenona 0,5 μM y antimicina 0,5 μM (**figura 5**).

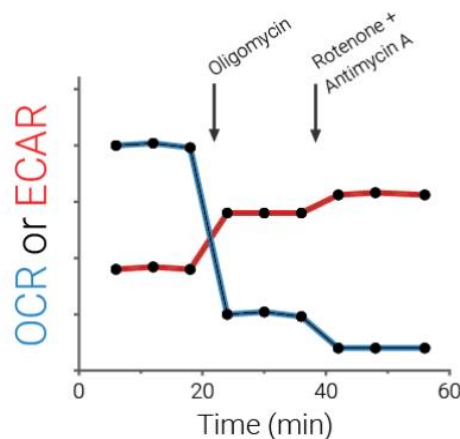


Figura 5. Esquema representativo del ensayo de medición de la tasa de obtención ATP

1. $\text{Glucose} + 2 \text{ ADP} + 2 \text{ Pi} \rightarrow 2 \text{ Lactate} + 2 \text{ ATP} + 2 \text{ H}_2\text{O} + 2 \text{ H}^+$ (Ecuación 1)
2. $\text{glycoATP Production Rate (pmol ATP/min)} = \text{glycoPER (pmol H}^+/\text{min)}$ (Ecuación 2)
3. $\text{OCR}_{\text{ATP}} \text{ (pmol O}_2/\text{min)} = \text{OCR (pmol O}_2/\text{min)} - \text{OCR}_{\text{Oligo}} \text{ (pmol O}_2/\text{min)}$ (Ecuación 3)
4. $\text{mitoATP Production Rate (pmol ATP/min)} = \text{OCR}_{\text{ATP}} \text{ (pmol O}_2/\text{min)} * 2 \text{ (pmol O/pmol O}_2) * \text{P/O (pmol ATP/pmol O)}$ (Ecuación 4)
5. $\text{ATP Production Rate (pmol ATP/min)} = \text{glycoATP Production Rate (pmol ATP/min)} + \text{mitoATP Production Rate (pmol ATP/min)}$ (Ecuación 5)

Todos los ensayos metabólicos con la técnica del Seahorse se realizaron cuando los mioblastos estaban a una confluencia del 90%. Para el estudio del metabolismo a lo largo de la diferenciación muscular la siembra de células se llevó a cabo en momentos diferentes para poder llegar a obtener, en la misma placa de Seahorse, las diferentes fases del proceso. Una hora antes del ensayo las células se incubaron a 37°C sin CO₂ y en el medio específico para el ensayo Seahorse a pH 7,4 (**Tabla 5**).

Medios de cultivo

	Ensayo de Función mitocondrial, Fenotipo metabólico y Tasa de obtención de ATP	Ensayo Función glucolítica
Medio Seahorse (MEM)	870 mg	870 mg
L-glutamina	2 mM	-
Glucosa	180 mg	-
Piruvato sódico	1 mM	-
pH	7,4	7,4

Tabla 5. Composición de los medios de cultivo previo al inicio del ensayo 1h antes.

7. ESTUDIO DEL METABOLISMO ANAEROBIO EN PACIENTES Y CONTROLES

En este trabajo, se ha estudiado la relación entre la Esclerosis Lateral Amiotrófica y el metabolismo muscular de la glucosa, en pacientes con la forma esporádica y en los estadios iniciales de la enfermedad.

Se trata de un diseño de casos y controles, en el que los pacientes fueron reclutados de la consulta de ELA, de la Unidad de Enfermedades Neuromusculares del Servicio de Neurología del Hospital Donostia. Todos ellos fueron informados del objetivo del estudio y firmaron un consentimiento informado aprobado por el CEIC (Comité Ético de Investigación Clínica) del Hospital. Los criterios de inclusión de los pacientes al estudio fueron: el ser diagnosticado de esta enfermedad recientemente y/o encontrarse en estadios iniciales de la patología, en los que la pérdida de funcionalidad todavía les permitiera realizar la prueba. Asimismo, se incorporaron al estudio familiares no consanguíneos conocidos que pudieran participar conjuntamente en el estudio, en su caso, como controles. Los controles se reclutaron entre los familiares no consanguíneos y amigos aportados de los pacientes.

7.1. Test de isquemia

Es una de las técnicas utilizadas en el estudio de la enfermedad de McArdle o glucogenosis tipo V, descrita por el mismo McArdle y estandarizada por Munsat (McArdle and Verel, 1956; Munsat, 1970). La enfermedad de McArdle consiste en una deficiencia congénita de la enzima miofosforilasa, alfa-1,4-glucanortofosfato glucosiltransferasa, que interviene en la degradación del glucógeno con liberación de glucosa-1-fosfato. Con el déficit o ausencia de dicha enzima, el glucógeno se acumula en el músculo con pérdida de

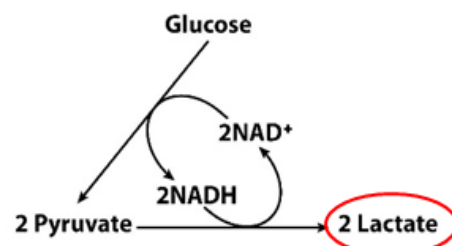


Figura 6. Glucólisis y fermentación láctica. Modificada de Nelson and Cox, 2008.

capacidad para el ejercicio, debilidad muscular, calambres y dolor. El test de isquemia consiste en generar una hipoxemia transitoria en uno de los antebrazos y en esa condición anaeróbica realizar un ejercicio físico de agarre sucesivo de algún objeto que permita la contracción rítmica de los músculos flexores y extensores de los dedos de la mano. Esta condición de anerobiosis local, obliga a los músculos a utilizar la vía glucolítica anaerobia como vía de obtención de ATP necesario para la contracción muscular. De esta manera, se pueden observar la existencia o no de alteraciones en el metabolismo de la glucosa. La finalidad de este método fue la medición de los niveles de lactato sanguíneo liberado, como reflejo del proceso metabólico que está actuando en el músculo; la glucolisis anaerobia. El producto de la glucolisis, el piruvato, se cataliza en un proceso de fermentación láctica por la enzima lactato deshidrogenasa, convirtiéndose así en lactato. De esta manera, analizando los niveles de lactato se pudo conocer el funcionamiento del metabolismo anaerobio de los pacientes.

En un individuo sano, se produce un incremento de lactato de 4 a 6 veces superior al valor basal (400-600%) con un pico máximo a los 1-2 minutos tras el ejercicio. En pacientes con la enfermedad de McArdle, en cambio, hay un mínimo aumento a lo largo del tiempo, debido a la inhibición de la vía glucolítica por la falta de disponibilidad del sustrato; la glucosa.

Además del lactato también se midieron los niveles de amonio en cada extracción. El amonio sirvió para controlar la intensidad del ejercicio. Al realizar un ejercicio los niveles de ADP aumentan, las células lo transforman

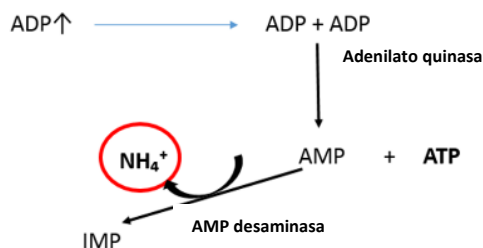


Figura 7. Reacciones consecutivas catalizadas por la adenilato quinasa y adenilato deaminasa, para la obtención de ATP con liberación de amonio.

en AMP y ATP, y a través de un reacción, catalizada por la enzima adenilato quinasa y que constituye el sensor de energía del organismo, se obtiene energía de forma muy rápida (Nelson and Cox, 2008). A su vez, el AMP, para mantener activa la reacción anterior, se transforma en IMP y amonio, desplazando el

equilibrio hacia la obtención de ATP. En base esta secuencia de reacciones, el amonio liberado indica el ATP consumido durante la contracción muscular que es proporcional a la intensidad del ejercicio realizado. Cuanta mayor sea la intensidad del ejercicio realizado, los valores de amonio en sangre serán más elevados. Así, se seleccionaron los pacientes y controles que realizaron el ejercicio con la intensidad correcta y se eliminó el sesgo producido por la debilidad muscular y la denervación, presentes en la patología, que podrían conducir a un ejercicio mal realizado. Excluidos los pacientes que no llegaban a los niveles fisiológicos, se estudió la actividad glucolítica de la musculatura antebraquial. Los niveles fisiológicos de amonio son 5 a 10 veces el valor basal con un pico máximo a los 2-5 minutos. Solamente se incluyeron los resultados del lactato de los participantes del estudio que presentaban estos valores en rango y en ese intervalo de tiempo, quedando excluidos el resto.

A los participantes se les extrajo dos tubos de sangre venosa del brazo con el que iban a realizar el ejercicio en condiciones basales. Tras el ejercicio isquémico, obtenido mediante un aumento de 20 mmHg de presión sistólica utilizando un esfigmomanómetro, se les extrajo sangre de forma seriada a los minutos 1, 3, 5 y 10.

Las muestras de sangre para determinación de amonio (NH_4^+) recogidos en tubo con anticoagulante EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) dipotásico, se transportaron al laboratorio en hielo, donde centrifugaron en frío y analizado inmediatamente. La medición de NH_4^+ se ha realizado en los equipos Cobas Integra 800 o Cobas c702 (Roche,) por un método enzimático con glutamato deshidrogenasa, la que cataliza la aminación reductora del α -cetoglutarato con NH_4^+ y NADPH para formar glutamato y NADP^+ . La concentración del NADP^+ que se mide por absorbancia a 340 nm, es directamente proporcional a la concentración de amonio.

Las muestras para medición de lactato se han extraído en tubo con heparina sódica, transportado al laboratorio en hielo y analizadas inmediatamente. La medición se ha realizado en un gasómetro GEM Premier 4000 (Werfen) mediante sensor amperométrico.

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron analizados por SPSS para Windows, versión 15.0. La normalidad se verificó mediante la prueba de Shapiro-Wilks ($p > 0.05$). Se usaron las pruebas *t* de Student y *U* de Mann-Whitney cuando se cumplieron o no los criterios de normalidad, respectivamente, para las comparaciones entre células control y células silenciadas en cualquiera de los genes *TARDBP*, *FUS* o *SOD1*, sobre los diferentes parámetros bioquímicos, metabólicos e histológicos determinados. Salvo que se indique lo contrario, los datos se expresan como la media \pm el error estándar de la media.

En el análisis de test de ejercicio isquémico, el resultado del número de individuos de cada grupo que alcanzaron el pico máximo de lactato al minuto uno y al minuto tres, siendo ésta una variable discreta, fue analizado en el software **Openepi** (software gratuito y de código abierto para estadísticas sobre epidemiología). Se aplicó el test de Fisher y no el test X^2 (chi cuadrado), debido a que al menos un valor esperado (fila total*columna total/gran total) era menor que 5.

La inferencia del tiempo de concentración máxima de lactato, se realizó mediante el ajuste de las curvas de cada individuo por modelos mixtos no lineales con ayuda del software R y el paquete "nimer".

Resultados

1. ESTUDIO DE CASOS-CONTROLES DEL METABOLISMO ANAEROBIO EN LA ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA

Prueba de ejercicio con isquemia en el antebrazo tiene un alto valor diagnóstico, con alta sensibilidad y especificidad, en la identificación de miopatías por afección del metabolismo anaerobio (Sanjurjo *et al.*, 2004). En el estudio participaron 21 pacientes y 19 controles, los cuales fueron seleccionados previamente y que tras el riguroso *screening* aplicado para la eliminación de los sesgos por debilidad muscular, denervación o ejercicio no realizado correctamente (ver el apartado **Material y métodos**), el número de participantes finalmente incluidos en el análisis de resultados fue 10 pacientes y 10 controles.

Tras llevar a cabo un ejercicio en isquemia, las concentraciones sanguíneas de amonio y lactato medidas a los minutos 1, 3, 5 y 10 tras el ejercicio, junto con los porcentajes respecto a los valores basales, están representados en las **figuras 1.3 y 1.4**. Con los datos obtenidos se distribuyeron los participantes, en una tabla de 2x2, formando 4 grupos diferentes, en los que el valor máximo de lactato aparecía al minuto 1 (pico 1') o al minuto 3 (pico 3') (**figura 1.1**).

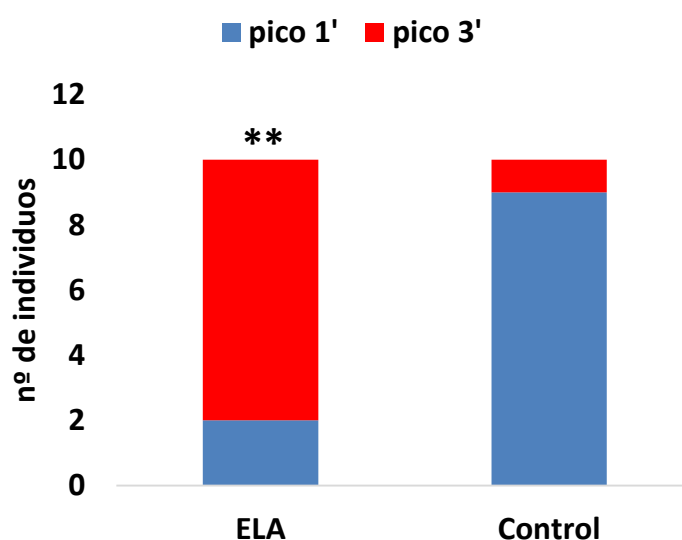


Figura 1.1. Distribución de los participantes en los cuatro grupos: ELA (pico 3'); ELA (pico 1'); Control (pico 3'); Control (pico 1'). Test Fisher. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$. Pacientes $n = 10$, controles $n = 10$.

La producción de lactato muscular en respuesta al ejercicio isquémico está alterada en pacientes con ELA en estadio temprano previo a la denervación del músculo ejercitado. En concreto, el pico de lactato se retrasa una fracción de tiempo en el 80% de los pacientes estudiados, mientras que este fenómeno ocurre sólo en un 10% de los controles ($p=0,0055$). Asimismo, se calculó el tiempo de inferencia del pico máximo de lactato para cada participante mediante una regresión no lineal. Mediante la inferencia estadística y utilizando modelos mixtos no lineales, se estimó el tiempo del pico de lactato en cada individuo, y como resultado se confirmó que el pico de lactato se encontraba retrasado en pacientes con ELA (2,52 min en pacientes vs 1,78 min en controles; $p=0.0075$) (**figura 1.2**). Estos datos sugieren que la velocidad de la glucólisis es menor en los pacientes, o lo que es lo mismo, los pacientes podrían tener una menor capacidad para activar la glucólisis.

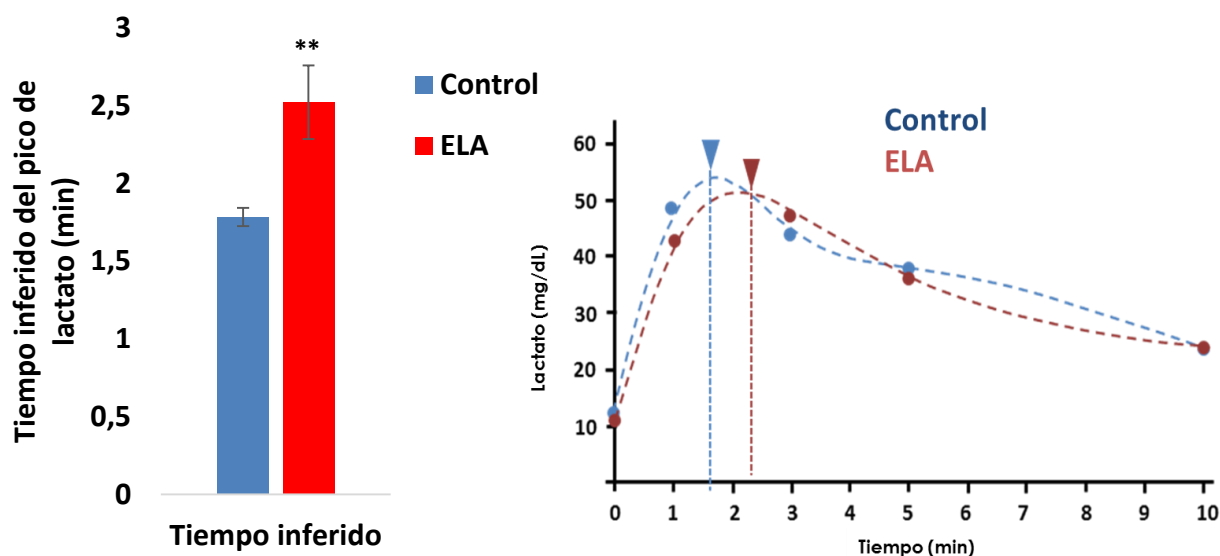


Figura 1.2. Estimación del tiempo del pico máximo de lactato. Ajuste de las curvas de cada individuo por modelos mixtos no lineales con ayuda del software R y el paquete "nlmer". Prueba t-student, * $p<0,05$. ** $p<0,01$. *** $p<0,001$. Pacientes $n=10$, controles $n=10$.

Estos resultados obtenidos en la prueba de ejercicio isquémico, en los que se observa un retraso en la producción de lactato, apoyan la tesis de la existencia de un trastorno glucolítico muscular asociado a la ELA.

Nº asignado	enfermedad	edad	sexo	Origen clínico	0	1	3	5	10	Pico Amm P (abs)	Pico Amm (%)
1	ela	61	hombre	bulbar	23,6	38,5	71,3	64,5	45,6	71,3	302,1
2	ela	45	mujer	bulbar	14	66,2	104,6	113,3	58	113,3	809,3
3	ela	59	mujer	espinal	19,3	58	25,5	27,6	26,3	27,6	143,0
4	ela	44	hombre	espinal	13,2	79	89,2	85,7	76,6	89,2	675,8
5	ela	55	hombre	espinal	26,5	39,3	50,2	32,9	30,5	50,2	189,4
6	ela	65	hombre	espinal	23,3	53,2	101,2	129,7	66,5	129,7	556,7
7	ela	64	mujer	espinal	22,8	86,5	92,8	41,9	32,4	92,8	407,0
8	ela	78	hombre	espinal	26,3	31,6	23	23,3	24,4	31,6	120,2
9	ela	64	hombre	bulbar	15,4	102,9	111,5	113	43,4	113,0	733,8
10	ela	38	hombre	espinal	11,7	31,6	23,3	23,6	15,6	31,6	270,1
11	ela	69	hombre	espinal	11,6	62,1	83,9	85	22,5	85,0	732,8
12	ela	68	hombre	ela	34,9	171,5	182,2	186,2	147,7	186,2	533,5
13	ela	71	mujer	ela	16	40,6	43,6	37,3	25	43,6	272,5
14	ela	59	hombre	espinal	11,9	205,3	227,4	268,7	263	268,7	2258,0
15	ela	78	mujer	espinal	19,8	51,5	72	60	31,8	72,0	363,6
16	ela	66	hombre	espinal	33,2	71,4	122,5	119	81,3	122,5	369,0
17	ela	70	hombre	espinal	11,3	66	69,6	55,3	20,4	69,6	615,9
18	ela	80	hombre	bulbar	18	77	107	106	88	107,0	594,4
19	ela	34	hombre	espinal	24	104	123	102	53	123,0	512,5
20	ela	76	hombre	espinal	18	30	32	30	23	32,0	177,8
21	ela	65	hombre	bulbar	31	55	44	38	40	55	177,4
22	control	48	mujer	control	17,9	127,7	123,5	107,4	98,1	127,7	713,4
23	control	47	hombre	control	18,5	70,5	87,6	85,2	46,8	87,6	473,5
24	control	50	mujer	control	10	76,1	110,8	97,4	36,4	110,8	1108,0
25	control	55	hombre	control	21,5	88,6	84,6	75	47,8	88,6	412,1
26	control	67	hombre	control	9	97,3	155	204,2	83,6	204,2	2268,9
27	control	75	mujer	control	21,9	117,8	127,4	103,5	37,1	127,4	581,7
28	control	64	mujer	control	35,8	134,8	162,1	176,8	29,9	176,8	493,9
29	control	48	mujer	control	9,8	323,6	343,2	225,5	138,5	343,2	3502,0
30	control	42	mujer	control	12,1	92,2	89,4	85	45,9	92,2	762,0
31	control	48	hombre	control	29,6	45,1	50,8	52,5	48,6	52,5	177,4
32	control	58	mujer	control	13	121,4	157	158,6	102,6	158,6	1220,0
33	control	68	hombre	control	37,8	98,5	93,8	91,1	75,5	98,5	260,6
34	control	69	mujer	control	11,7	82,4	130,5	148,3	101,1	148,3	1267,5
35	control	49	hombre	control	11,9	151,5	174,4	158,9	135,9	174,4	1465,5
36	control	72	mujer	control	16	57,5	36,9	30	24,8	57,5	359,4
37	control	78	mujer	control	22	38	59	76	40	76,0	345,5
38	control	32	mujer	control	18	93	116	115	89	116,0	644,4
39	control	74	mujer	control	20	93	104	54	30	104,0	520,0
40	control	64	mujer	control	16	55	53	32	27	55,0	343,8

Figura 1.3. Medida de las concentraciones de amonio en sangre tras el ejercicio isquémico. **Individuos excluidos** del estudio (rojo) cuyos valores de amonio no cumplen con los criterios de realización del ejercicio a una intensidad homogénea y correcta para la comparación entre los grupos. Controles n=19; pacientes n=21.

Resultados

Nº asignado	enfermedad	edad	sexo	Origen clínico	0	1	3	5	10	Pico Lactato (%)	Tiempo de pico inferido
1	ela	61	hombre	bulbar	12	29	34	25	18	283,3	
2	ela	45	mujer	bulbar	7	44	47	41	23	671,4	1,9379930
3	ela	59	mujer	espinal	6	23	13	8	9	383,3	
4	ela	44	hombre	espinal	13	52	40	34	25	400,0	1,5351100
5	ela	55	hombre	espinal	10	18	34	24	10	340,0	
6	ela	65	hombre	espinal	12	40	49	40	22	408,3	2,4350910
7	ela	64	mujer	espinal	9	38	37	26	9	422,2	
8	ela	78	hombre	espinal	7	28	15	14	8	400,0	
9	ela	64	hombre	bulbar	9	59	54	35	22	655,6	1,7185520
10	ela	38	hombre	espinal	9	35	33	9	9	388,9	
11	ela	69	hombre	espinal	9	38	51	40	27	566,7	2,6592100
12	ela	68	hombre	espinal	14	52	71	59	39	507,1	2,7407050
13	ela	71	mujer	espinal	9	34	41	29	19	455,6	
14	ela	59	hombre	espinal	26	47	63	62	63	242,3	3,7369610
15	ela	78	mujer	espinal	8	47	48	33	16	600,0	
16	ela	66	hombre	espinal	9	36	43	40	24	477,8	
17	ela	70	hombre	espinal	9	33	46	41	23	511,1	3,4218700
18	ela	80	hombre	bulbar	17	40	44	36	31	258,8	1,9643090
19	ela	34	hombre	espinal	16	49	55	52	33	343,8	3,1474000
20	ela	76	hombre	espinal	9	31	35	23	19	388,9	
21	ela	65	hombre	bulbar	6	17	11	8	7	183,3	
22	control	48	mujer		8	47	39	27	19	587,5	1,6332550
23	control	47	hombre		13	38	37	31	23	292,3	
24	control	50	mujer		15	46	40	36	10	306,7	1,6275160
25	control	55	hombre		9	51	33	31	18	566,7	
26	control	67	hombre		8	68	61	58	35	850,0	1,6797460
27	control	75	mujer		14	44	43	29	16	314,3	1,8568070
28	control	64	mujer		15	48	47	41	13	320,0	1,8184460
29	control	48	mujer		12	61	59	49	31	508,3	1,7940320
30	control	42	mujer		8	42	38	35	21	525,0	1,7166380
31	control	48	hombre		12	25	22	19	15	208,3	
32	control	58	mujer		7	47	46	42	31	671,4	1,8181830
33	control	68	hombre		14	37	36	34	25	264,3	
34	control	69	mujer		14	51	40	41	32	364,3	1,5151160
35	control	49	hombre		19	49	50	40	33	263,2	
36	control	72	mujer		8	30	26	20	11	375,0	
37	control	78	mujer		19	20	24	21	20	105,3	
38	control	32	mujer		7	24	29	29	26	342,9	
39	control	74	mujer		15	39	41	28	16	260,0	2,3822120
40	control	64	mujer		10	62	44	18	18	620,0	

Figura 1.4. Medida de las concentraciones de lactato en sangre tras el ejercicio isquémico. **Individuos excluidos** del estudio (rojo) cuyos valores de amonio no cumplen con los criterios de realización del ejercicio a una intensidad homogénea y correcta para la comparación entre los grupos. Controles n=19; pacientes n=21.

Si se distribuyen los pacientes en función del sexo, hombre/mujer, o forma clínica, espinal/ bulbar, no existen diferencias significativas ($p>0,05$) entre cada subgrupo (**figura 1.5**). Ni la variante clínica ni el sexo, determinan el retraso en la activación de la glucólisis anaerobia.

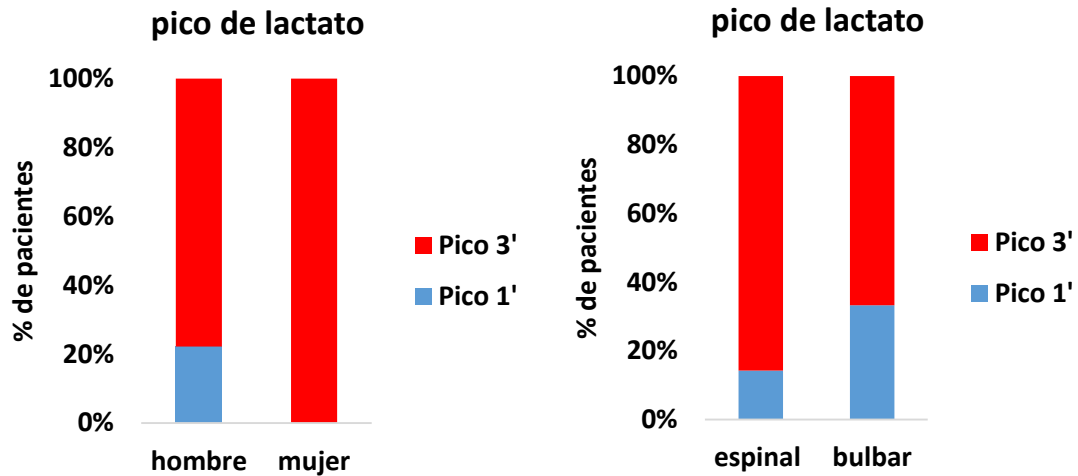


Figura 1.5. Distribucion de los pacientes por sexo y origen clínico. No constituyen factores de riesgo para la alteración del metabolismo anaerobio. Prueba Fisher, $p>0,05$, (n=10).

2. ANÁLISIS DEL METABOLISMO A LO LARGO DE LA DIFERENCIACIÓN EN CÉLULAS MUSCULARES.

2.1. Modelo celular y estadios de la diferenciación de células musculares

El modelo celular elegido en este trabajo es la línea de mioblastos humanos inmortalizados 8220, la cual supone una alternativa legítima al modelo murino de mioblastos C2C12, para estudiar los mecanismos de diferenciación muscular en humanos (Zhu *et al.*, 2007) (Dr. Vincent Mouly, Center of Research in Myology, Paris). Los mioblastos son un tipo celular proliferativo y de fácil cultivo en el laboratorio. Son apropiados para el estudio de las fases miogénicas de proliferación y diferenciación mioblástica hasta la formación de miotubos. Sin embargo, no son útiles para la investigación de las fases tempranas de la miogénesis: activación y determinación de células precursoras musculares.

El proceso de diferenciación y fusión mioblástica *in vitro* puede reproducirse de forma inducida, mediante la adición exógena de suplementos y factores inductores de la diferenciación, o estudiarse de forma espontánea. En esta última, los mioblastos proliferan en medio estándar hasta alcanzar la inhibición por contacto (o confluencia 100%), a partir de la cual se ponen en marcha de forma espontánea los mecanismos de diferenciación a miocito y los eventos de fusión que dan lugar eventualmente a la formación de sincitios celulares o miotubos tempranos.

Tras la aplicación del protocolo de diferenciación espontánea en la línea celular 8220, se observa que los mioblastos proliferan a la vez que adquieren progresivamente una morfología fusiforme característica del miocito hasta que alcanzan el 100% de confluencia, a partir de la cual comienzan los fenómenos de alineación y fusión. A partir del día 1 tras los primeros eventos de fusión, aparecen los primeros miotubos. A día 3 de diferenciación la mayoría de los mioblastos dan lugar a miotubos (**figura 2.1**).

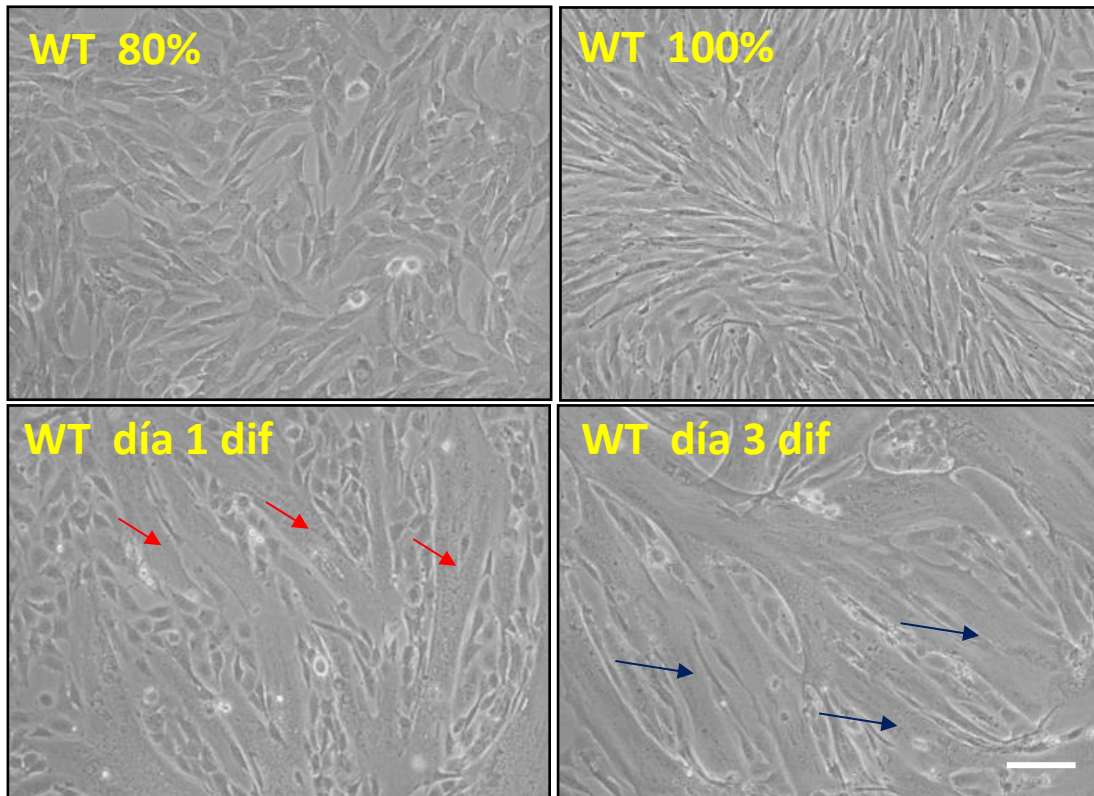


Figura 2.1. Imágenes al microscopio óptico del proceso de diferenciación muscular en la línea de mioblastos humanos 8220 tras la aplicación de un protocolo de diferenciación espontánea. WT 90% (mioblastos wild type a 90% de confluencia); WT 100%, (mioblastos a confluencia total.); WT día 1 dif (primer día en el que aparecen los primeros miotubos, **flechas rojas**); WT día 3 de dif (tercer día tras el inicio de la aparición de los miotubos, en los que se observan unos miotubos más gruesos y grandes, **flechas azules**). Escala 38 μm .

2.2. El metabolismo energético cambia a lo largo del proceso de diferenciación muscular

Los cambios morfológicos que se producen en la diferenciación de células musculares tienen que ir acompañados de cambios metabólicos, pues la diferenciación de mioblastos a miotubos conlleva una activación de la síntesis de proteínas que van formar parte de los elementos celulares que caracterizan al miotubo, como constituyen el sarcómero y todo el aparato contráctil (Abreu, 2018; Ohlendieck, 2010; Ryall, 2013). El metabolismo energético se ha estudiado por la técnica *Seahorse Analyzer* que utiliza metodología optimizada para el análisis a tiempo real de los flujos bioenergéticos celulares. Este instrumento realiza dos tipos de mediciones en el medio celular: el pH que se deriva de la producción de ácido láctico a

través de la glucólisis anaeróbica, y el consumo de O_2 resultante de la respiración mitocondrial. Con estas medidas se calculan las tasas de acidificación extracelular (ECAR) y la tasa de consumo de O_2 (OCR), que son índices de flujo glucolítico y respiración oxidativa, respectivamente. Mediante la adición de compuestos que modulan la actividad mitocondrial a lo largo del ensayo, se van midiendo estos parámetros de los cuales mediante un software del propio método se obtienen diferentes datos de actividad metabólica (**figura 2.2**).

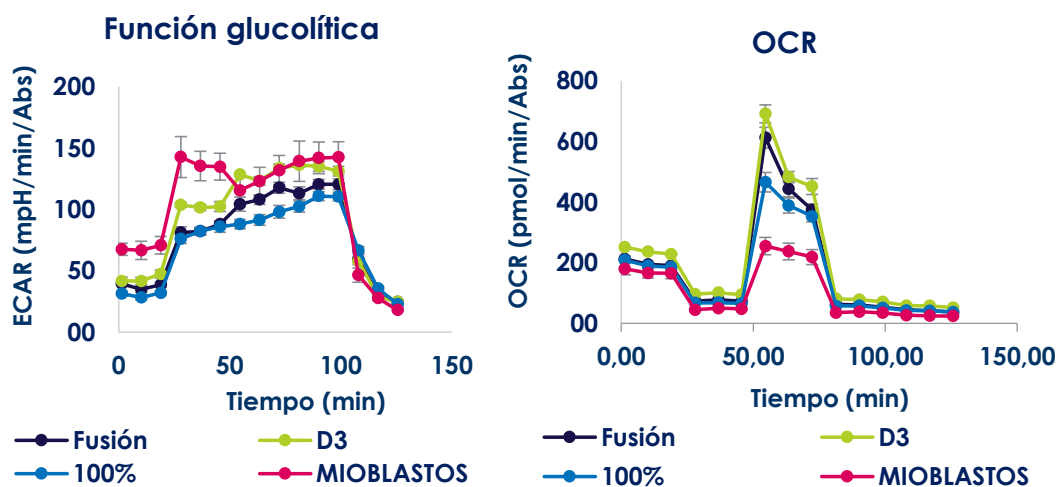


Figura 2.2. Medida de la actividad metabólica del proceso de diferenciación celular en mioblastos humanos inmortalizados (n=3).

Asimismo, la adición secuencial de dichos compuestos genera un estrés en la célula al que cada tipo celular responde de una manera diferente reflejada como potencial metabólico. Este potencial metabólico es la capacidad de activar tanto la glucólisis como la actividad mitocondrial con respecto al estado basal sin estrés. En la **figura 2.3** se puede ver como los diferentes estadios, de diferenciación, mioblasto, miocito, fusión y miotubo, presentan, de forma significativa, un mayor potencial glucolítico y mitocondrial con respecto a los mioblastos. Estos resultados confirman que los cambios morfológicos asociados al proceso de diferenciación muscular están acompañados por cambios bioenergéticos.

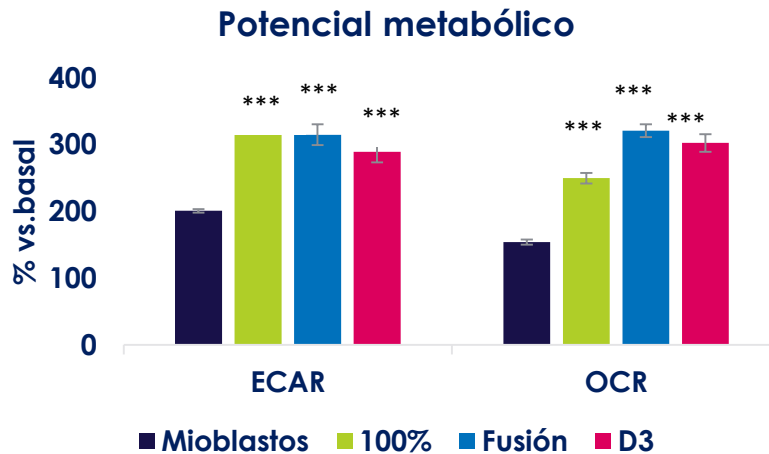


Figura 2.3. El potencial metabólico aumenta, con respecto a los mioblastos, durante la diferenciación celular muscular. Prueba t-student * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$, (n=3).

Además de su potencia metabólica diferente, los mioblastos tienden a recurrir más a la glucólisis que a la respiración mitocondrial para suplir su necesidad energética.

El ensayo de estrés metabólico muestra un aumento significativo del ECAR en relación al OCR en mioblastos en proliferación. Sin embargo, a medida que avanza la diferenciación el estrés metabólico provoca tanto un aumento en el ECAR como, particularmente, en el OCR, de manera que, la relación ECAR/OCR se ve disminuida en comparación con los mioblastos en proliferación (**figura 2.4**). A medida que avanza la diferenciación el metabolismo oxidativo cobra más importancia, aunque se mantiene la capacidad glucolítica. En la **figura 2.4** el eje de abscisas corresponde a la glucólisis y el de ordenadas, a la respiración aerobia. Cuando se genera un estrés celular metabólico, el metabolismo celular se activa para resolver este estrés. La contribución glucolítica reflejada en el avance a lo largo del eje de abscisas, en proporción, es mayor en los mioblastos que la respiración mitocondrial. Sin embargo, en los miotubos ocurre lo contrario; recurren tanto a la respiración mitocondrial como a la glucólisis.

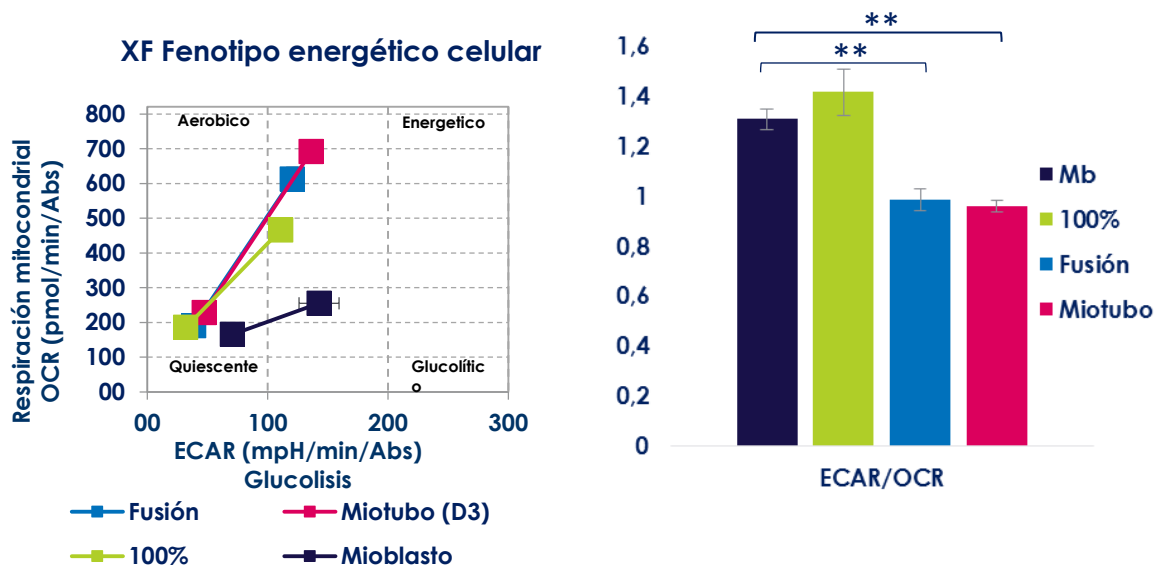


Figura 2.4. El tipo de vía metabólica a la que se recurre para suplir las necesidades energéticas cambia a lo largo del proceso de diferenciación celular. Test t-student, * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$, (n=3).

A partir del análisis del tipo de metabolismo prioritario en los diferentes estadios miogénicos, se puede inferir que en las fases proliferativas del mioblasto e inmediatamente previas a los eventos de fusión, la glucólisis anaeróbica es el recurso energético principal, mientras que la obtención de energía a partir del metabolismo oxidativo cobra más importancia en las fases de formación de miotubos.

Se estudiaron los niveles de expresión de las enzimas reguladoras más importantes de la glucólisis en diferentes fases miogénicas, con la intención de identificar cambios en alguna de estas enzimas que pudieran reflejar los cambios en la actividad glucolítica. Y así, se observó que una de las enzimas más importantes de la regulación de la glucólisis, la PFK2 (PFKFB3 isoforma muscular), estaba aumentada de manera acentuada en el momento de fusión (**figura 2.5**), lo cual se corresponde con el aumento del potencial glucolítico observado mediante el *Seahorse* en este punto de la diferenciación.

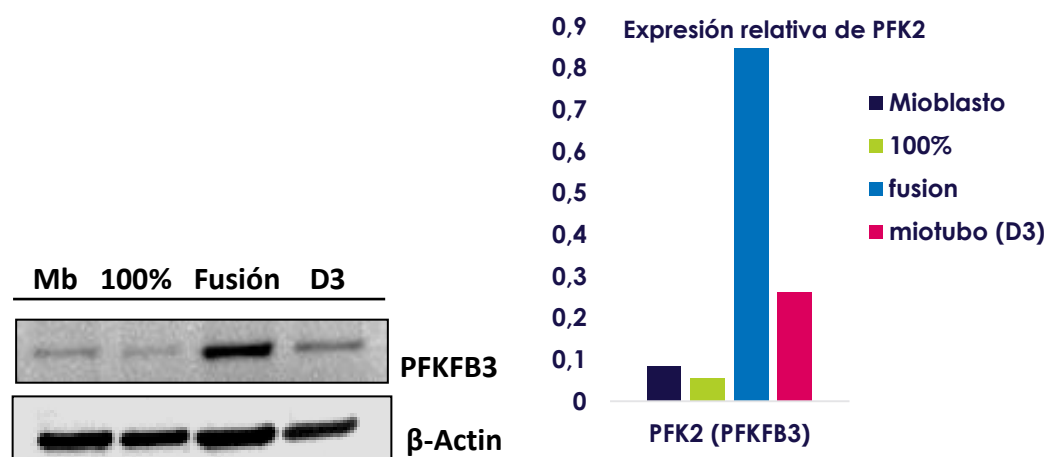


Figura 2.5. La expresión de la enzima PFK2 aumenta considerablemente en el punto de fusión de mioblastos (n=2).

2.3. La inhibición de la glucólisis bloquea el proceso de diferenciación celular, activando el sistema ubiquitin proteasoma

La fase de diferenciación, en la que la potencia glucolítica aumenta considerablemente, es el momento en el que los mioblastos se transforman en miocitos a confluencia 100% y el momento en que empiezan a fusionar generándose los primeros miotubos. Es en esta fase, se añadió al medio de cultivo celular el inhibidor competitivo de la glucólisis, 2-deoxiglucosa (2-dg), a una concentración final de 100 μ M durante 48 horas. La 2-dg es un análogo de la glucosa que tiene sustituido un hidrógeno por el radical hidroxilo (-OH) en el carbono 2, por lo que no es capaz de entrar en la ruta de la glucólisis. La enzima hexoquinasa reconoce este compuesto que compite con la glucosa. De esta manera, la glucólisis se inhibe desde la primera reacción. El tratamiento con 2-dg durante 48 horas en mioblastos al 100% de confluencia, inhibe la fusión, pero no su alineación y la formación de miotubos (**figura 2.6, A**; flechas rojas), en comparación con los mioblastos sin tratamiento, que fusionan de forma espontánea formando los primeros

miotubos. La inmunofluorescencia para MyHC muestra la ausencia de miotubos tras el tratamiento con 2-dg (**figura 2.6, B**).

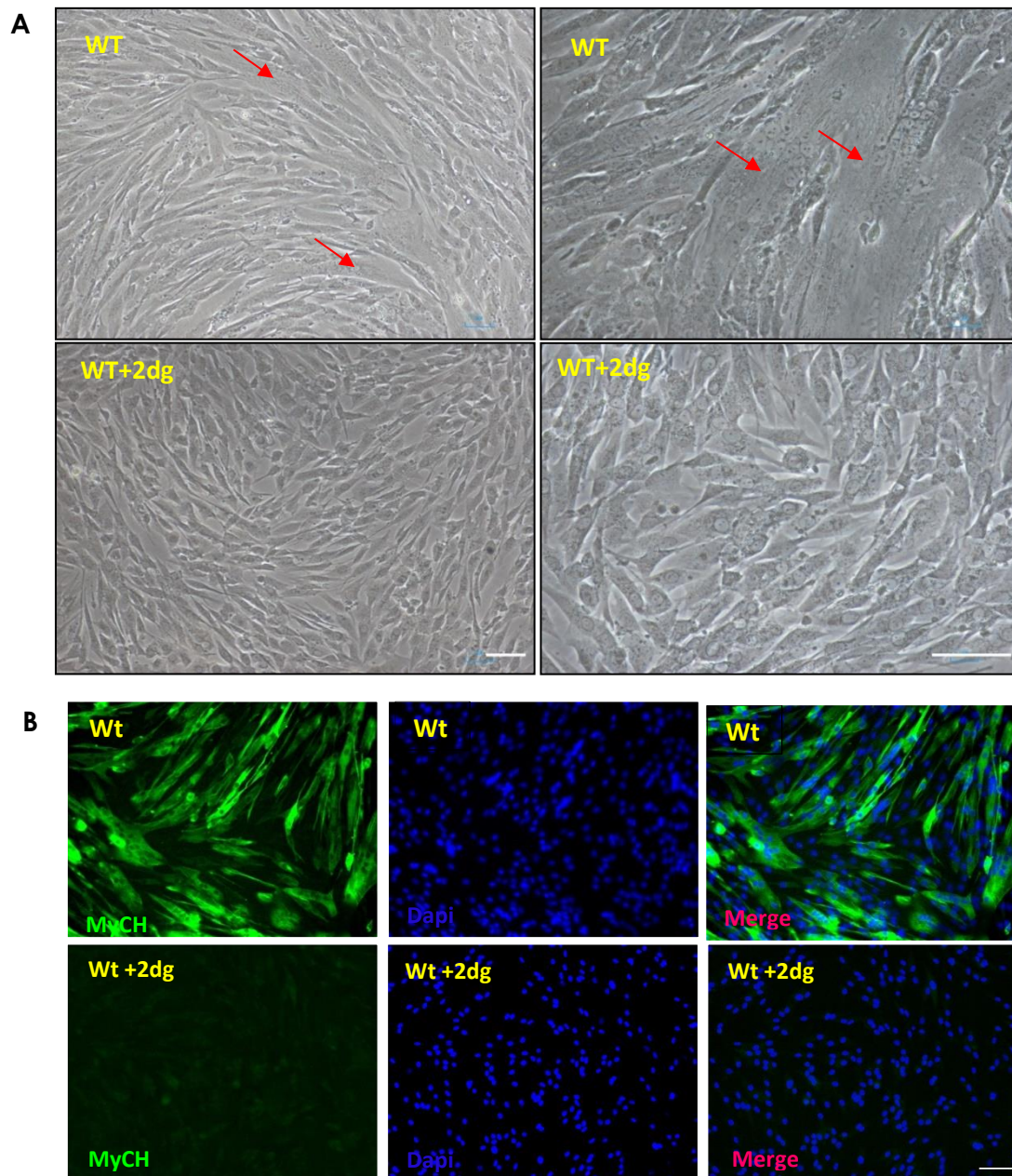


Figura 2.6. A, Inhibición de la fusión celular tras el tratamiento con 2-dg 100 μ M 48h en mioblastos humanos immortalizados. Miotubos formados (flechas rojas) en los mioblastos no tratados. B, Inmunofluorescencia de MyCH (verde), marcador de miotubo. El tratamiento con 2dg bloquea la diferenciación celular. Escala 38 μ m.

La proteína que funciona como factor de transcripción y que desencadena todo el proceso de diferenciación celular, es la MyoD. Esta proteína aumenta en la fase de fusión y en los miotubos tempranos, para activar el proceso de diferenciación (**figura 2.7**).

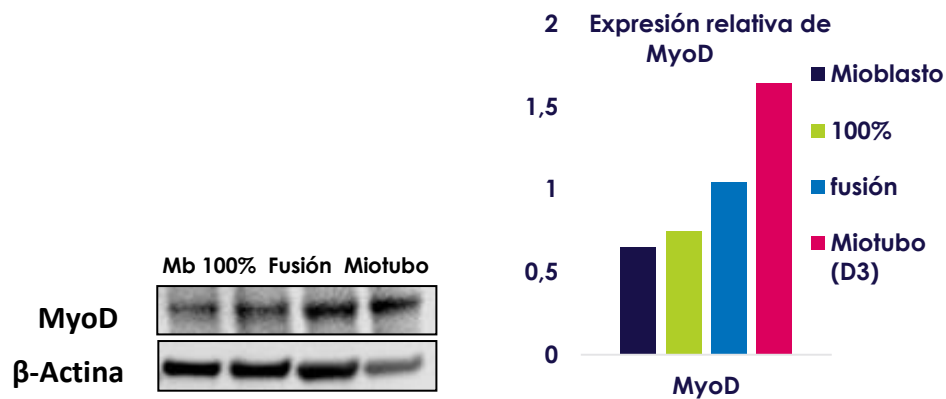


Figura 2.7 La expresión de MyoD aumenta durante la fusión y en los miotubos tempranos (D3), (n=2).

Se observa que el tratamiento con 2-dg disminuye significativamente los niveles de proteína de MyoD, analizada tanto por WB como por inmunofluorescencia (**figura 2.8**). Los niveles de MyoD están sujetos a mecanismos de regulación muy sofisticados. Por ejemplo, ante diversas situaciones pro-atróficas creadas por estrés energético, denervación o sarcopenia, la MyoD se degrada en el sistema ubiquitin proteasoma (Bodine and Baehr, 2018; Gomes *et al.*, 2001; Tintignac *et al.*, 2005) por E3 ligasas específicas: Atrogina-1 (Fbxo32) y Murf-1 (Trim63). El tratamiento con 2-dg aumenta significativamente la expresión de dichas ligasas activando el sistema ubiquitin proteasoma y degradando la MyoD. El análisis de expresión de todas estas proteínas se ha realizado en la misma fase de diferenciación, tanto en los mioblastos no tratados como en los tratados con 2-dg, ambos en estadio 100% de confluencia antes de comenzar la fusión. Por ello, las diferencias de expresión de MyoD observadas no son necesariamente secundarias al cambio de estadio miogénico, sino que el propio 2-dg, al inhibir el metabolismo glucolítico, podría inducir de forma directa la degradación de MyoD a través del proteosoma, y con ello impedir la diferenciación celular.

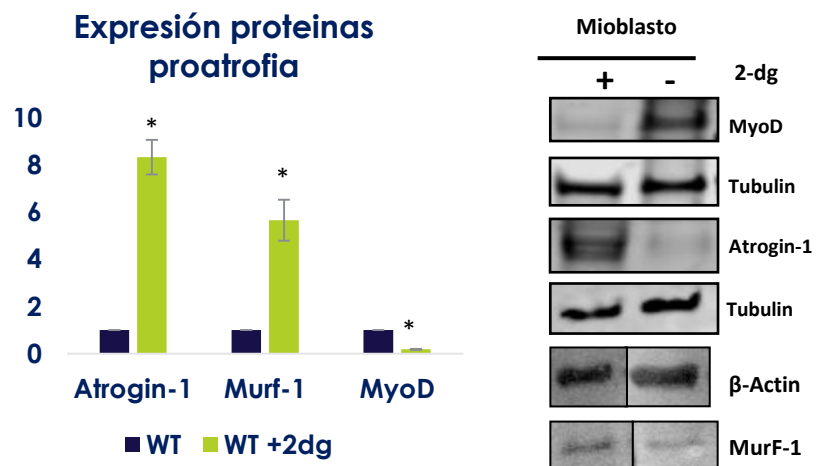
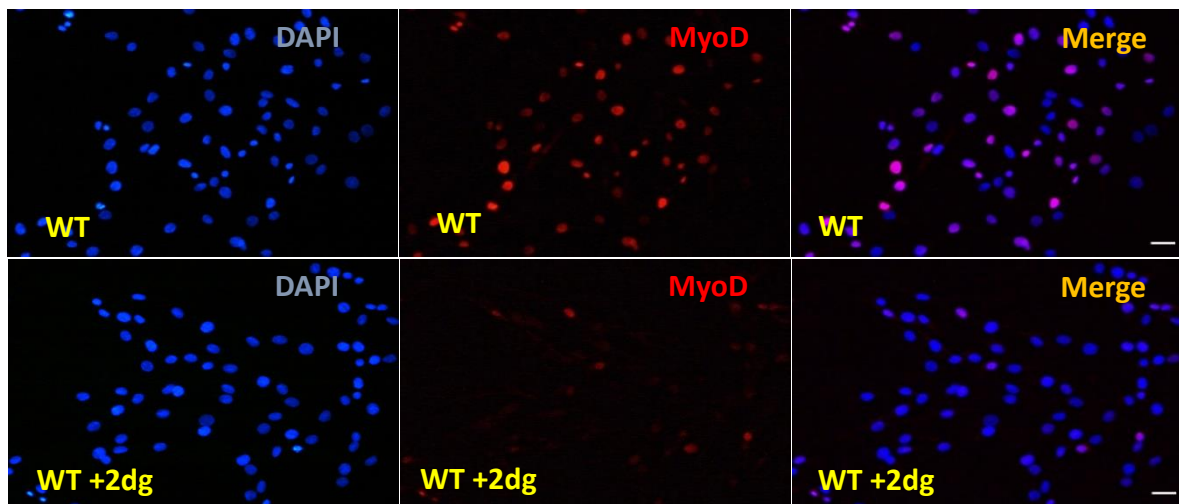


Figura 2.8. Disminución de la expresión de MyoD e Incremento de la expresión de las E3 ligasas Atrogenin-1 y Murf-1 mediante WB e inmunofluorescencia; MyoD (rojo) y DAPI (azul). Prueba t- Student, (n=3), *p<0,05 **p<0,01***p<0,001. Escala 9 μ m.

2.4. Los factores FoxO1 y FoxO3 median la activación del sistema ubiquitin-proteasoma en respuesta a la inhibición de la glucólisis

La expresión de las E3 ligasas, Atrogenin-1 y Murf-, del sistema ubiquitin proteasoma está estrechamente regulada por los factores de transcripción de la familia FoxO (Gomes *et al.*, 2001; Mcloughlin *et al.*, 2019). Ante determinados tipos de estrés celular (ej. estrés oxidativo) estos factores, especialmente los predominantes en músculo esquelético como son, FoxO1 y FoxO3, se translocan al núcleo y allí ejercen su actividad como factores de transcripción activando o inhibiendo la expresión de genes diana (Xu *et al.*, 2017). En concreto, la expresión de las E3 ligasas Atrogenin-1 y Murf-1 se regula

al alza, mientras que la expresión de MyoD se regula a la baja. Por ello, los factores FoxO son reguladores de los niveles celulares de MyoD tanto a nivel de expresión como a nivel de su degradación (McFarlane *et al.*, 2006; Kitamura *et al.*, 2007). En base a estas evidencias, se analizó mediante inmunofluorescencia la localización celular de los factores FoxO1 y FoxO3 tras el tratamiento con 2-dg, para determinar si el estrés celular inducido por la inhibición de la glucólisis es capaz de activar estos factores de transcripción, y en consecuencia ofrecer una explicación potencial a la activación del sistema ubiquitin-proteosoma específico de MyoD. En esta inmunofluorescencia se observa que los mioblastos tratados con 2-dg presentan una mayor expresión y localización nuclear tanto de FoxO1 como de FoxO3 en comparación con los mioblastos no tratados. Este resultado indica la relación directa entre el metabolismo y la translocación de dichos factores **(figura 2.9)**.

2.5. La expresión y localización de los factores FoxO1 y FoxO3 cambia durante la diferenciación muscular

Hasta este punto del trabajo, se ha demostrado que el proceso de diferenciación de mioblastos humanos a miotubos es un proceso altamente energético **(figura 2.3)** y que antes de la fusión celular, correspondiente a un estado de 100% de confluencia, el metabolismo predominante es glucolítico **(figura 2.4)**. Además, se ha demostrado que el metabolismo glucolítico es determinante en la fase miogénica de fusión, puesto que la inhibición de la glucólisis, en dicha fase de diferenciación, bloquea este proceso. Por otro lado, se ha observado que los niveles de expresión de MyoD, factor de transcripción necesario para poner en marcha la maquinaria de diferenciación celular en el mioblasto, disminuyen considerablemente cuando la glucólisis es inhibida **(figura 2.8)**. Este fenómeno puede estar mediado por una activación de la expresión y translocación de los factores

FoxO al núcleo en respuesta a estrés celular, que eventualmente induciría la activación del sistema ubiquitin-proteasoma y la disminución de MyoD.

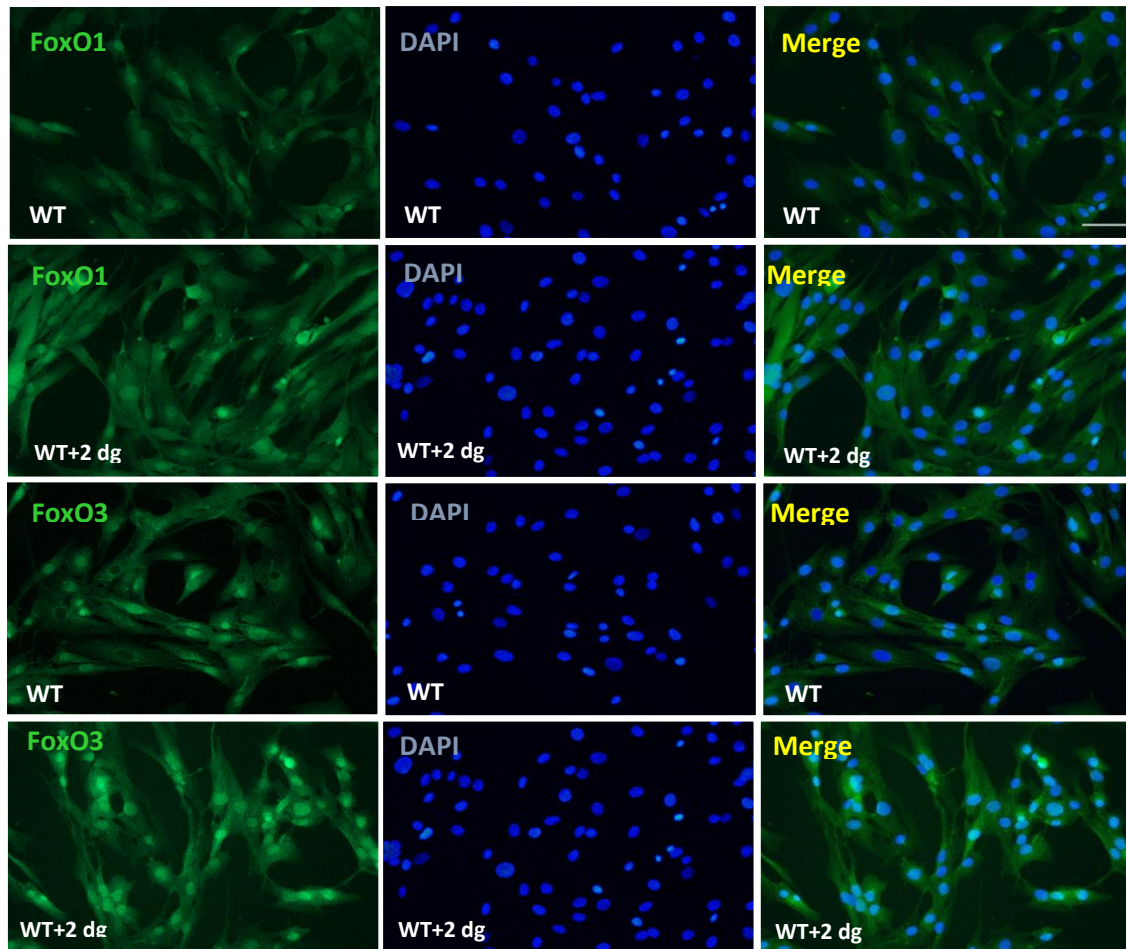


Figura 2.9. Incremento en la expresión y translocación de los factores FoxO1 y FoxO3 al núcleo por inmunofluorescencia; FoxO1 y FoxO3 (verde) y DAPI (azul). Escala 38 μ m.

Teniendo todas estas evidencias en cuenta, se ha estudiado la expresión y localización celular de dichos factores FoxO durante el proceso de diferenciación celular, mediante inmunofluorescencia y cuantificación proteica en los diferentes compartimentos celulares (citoplasma vs. núcleo) por Western blot. Las distintas fases de la diferenciación analizadas por fraccionamiento celular y Western blot son: mioblastos (70% de confluencia), miocitos (100% de confluencia), fusión (D1; día 1 de diferenciación, MyHC positivo) y miotubos tempranos (D3; día 3 de diferenciación). Las fases de la diferenciación analizadas por inmunofluorescencia son: mioblastos (70% de confluencia), fusión (D1; día 1 de diferenciación MyHC positivo), miotubos

tempranos (D2 y D3; día 2 y 3 de diferenciación, respectivamente). La cuantificación de los factores FoxO1 y FoxO3 mediante los fraccionamientos celulares se han realizado con respecto a la proteína exclusivamente citoplasmática, Tubulina y la proteína nuclear, Histona 3 (H3). A la vista de que los niveles de MyoD aumentan a lo largo de los diferentes estadios de diferenciación (**figura 2.7**), es legítimo especular que los factores de transcripción FoxO deberían mantenerse inactivos y, por tanto, mostrar deslocalización nuclear para no impedir la diferenciación. Y en este sentido, los resultados obtenidos confirman que la localización del factor FoxO1 es mayoritariamente citoplasmática en todas las fases de la diferenciación celular estudiadas, con niveles que aumentan en el punto de fusión (**figura 2.10**). Por el contrario, la localización de FoxO3 es nuclear en todas las fases de la diferenciación. No obstante, la expresión nuclear de FoxO3 decae notablemente a medida que avanza el proceso sin ninguna evidencia de translocación hacia el citoplasma (**figura 2.10**).

Las imágenes de inmunofluorescencia muestran una equivalencia con los resultados del WB. La localización de FoxO1 es citoplásmica (rojo) y aumenta a 100% de confluencia, y desciende en el momento de fusión con respecto a los mioblastos en proliferación (**figura 2.11**). Para visualizar mejor esta diferencia, se muestra en una misma imagen donde co-habitan tipos celulares en varios estadios de diferenciación: mioblasto, fusión, miotubo a día 2 de diferenciación (D2) y miotubo a día 3 de diferenciación (D3).

Con respecto a FoxO3, en las imágenes de inmunofluorescencia en las que FoxO3 está marcado en verde y el marcador de miotubos, MyHC, en rojo, se observa cómo a medida que avanza el proceso de diferenciación la localización nuclear de FoxO3 disminuye (**figura 2.11**).

Al igual que los datos mostrados por fraccionamiento y WB, la disminución de FoxO3 nuclear no viene acompañada de una translocación al citoplasma. Por eso, aunque en la imagen de FoxO3 a día 3 de diferenciación se aprecia un aumento de FoxO3 citoplásmico, puede deberse a una unión inespecífica del anticuerpo frente a FoxO3 a alguna proteína propia del miotubo.

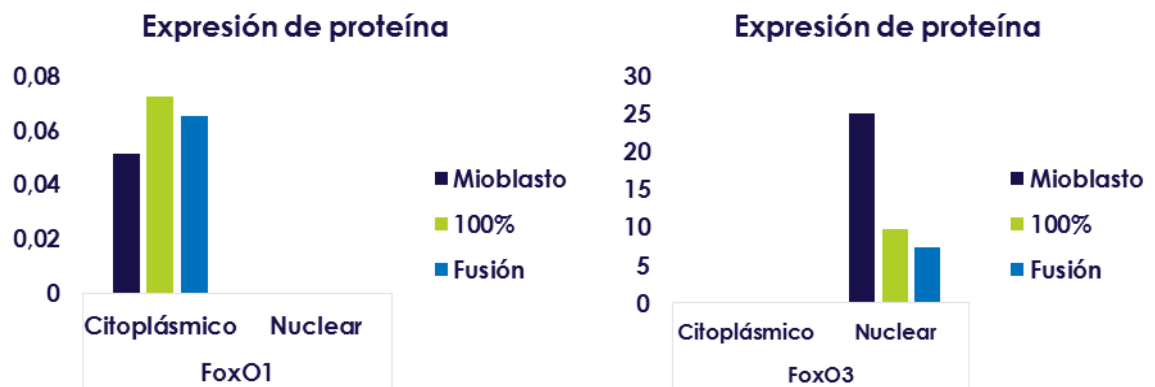
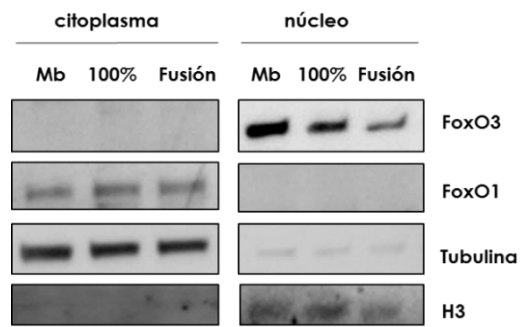


Figura 2.10. Localización citoplásmica de FoxO1 y localización nuclear descendente de FoxO3 en el proceso de diferenciación celular medida por fraccionamiento shTDP43/shFOXO, (n=2).

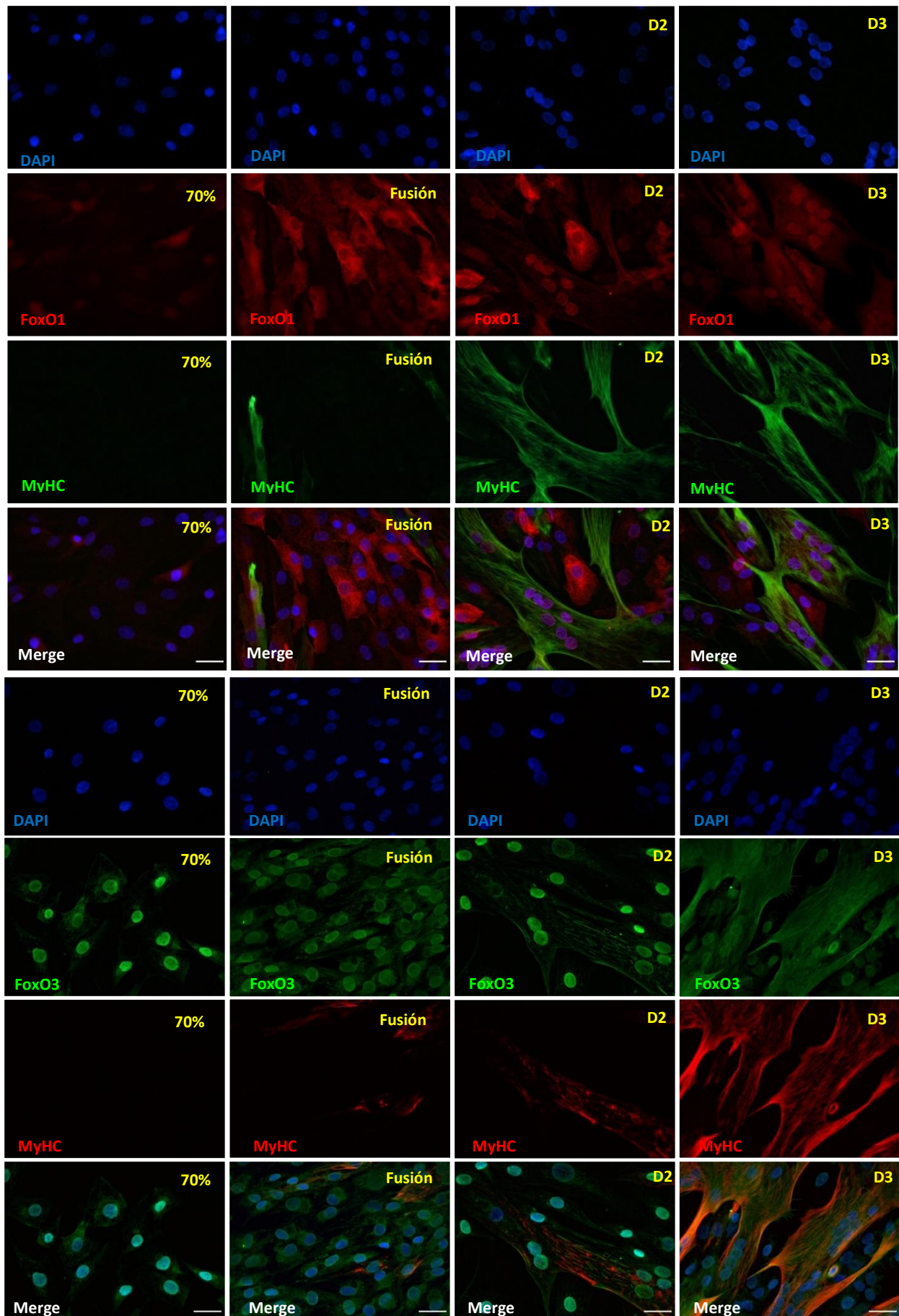


Figura 2.11. Localización celular de los factores FoxO1 y FoxO3 durante la diferenciación celular muscular. Inmunofluorescencia; FoxO1 (rojo)/MyHC (verde), FoxO3 (verde)/MyHC (rojo). Estadíos: 70% de confluencia, miocito-fusión (día 1 de diferenciación), D2 (día 2 de diferenciación) y D3 (día 2 de diferenciación, miotubos tempranos). Escala 38 μ m.

3. ESTUDIO DEL PAPEL DE LOS GENES *TARDBP*, *SOD1* Y *FUS* EN LA DIFERENCIACIÓN MUSCULAR Y SU RELACIÓN LA ATROFIA MUSCULAR

3.1. Expresión y localización celular de las proteínas *SOD1*, *TDP-43* y *FUS* durante la diferenciación del mioblasto

Diversos estudios en músculo de pacientes con ELA han reportado la existencia de una alteración en diferenciación celular de mioblastos a miotubos (Tokutake *et al.*, 2015; Pradat *et al.*, 2011). Con el objetivo general de investigar la relación entre la ELA y los mecanismos intrínsecos de patología muscular independientes de los procesos denervativos, el primer paso que se ha acometido es el de analizar el papel de varios de los genes vinculados con las formas mendelianas de ELA (*TARDBP*, *SOD1* Y *FUS*), en el proceso de diferenciación muscular desde mioblasto a miotubo temprano. Tanto los cambios de expresión como de localización de estas proteínas durante el proceso de diferenciación han sido analizados en la línea de mioblastos humanos inmortalizados 8220. En concreto, *TDP-43* y *FUS* son ribonucleoproteínas con función reguladora en el *splicing* de RNA. Su localización es fundamentalmente nuclear, pero sufren procesos de translocación citoplasmática, como parte de su función como transportador y estabilizador de los ARNm y como parte de los mecanismos celulares de respuesta a estrés, para regular el programa post-transcripcional de la célula en el citosol. Por ello, es posible especular que estas proteínas estén sujetas a cambios de su localización celular a lo largo del proceso de diferenciación miogénica, pues es un proceso que conlleva la expresión de nuevas proteínas que van a formar parte del elemento contráctil del miotubo (McKenna and Fry, 2017). *SOD1* es una proteína citoplasmática cuya función es transformar los radicales libres superóxido $O_2^{\cdot-}$, provenientes mayormente de la respiración oxidativa mitocondrial, en oxígeno molecular (O_2) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Como se muestra en la **figura 3.1**, los niveles de la proteína *SOD1* medidos por WB aumentan significativamente en la fase

de fusión y se mantienen elevados durante los estadios tempranos de formación de miotubos. Este resultado es compatible con el aumento del metabolismo oxidativo en los miocitos, y durante la fusión y obtención de los miotubos tempranos **(figura 2.3)**. De hecho, el punto máximo de expresión se encuentra en la fase de confluencia 100%, cuando los miocitos comienzan a alinearse para su fusión. Es en este momento de la diferenciación cuando comienza a aumentar el metabolismo oxidativo, a pesar de que la glucólisis siga siendo la vía metabólica de preferencia de esta fase **(figura 2.4)**.

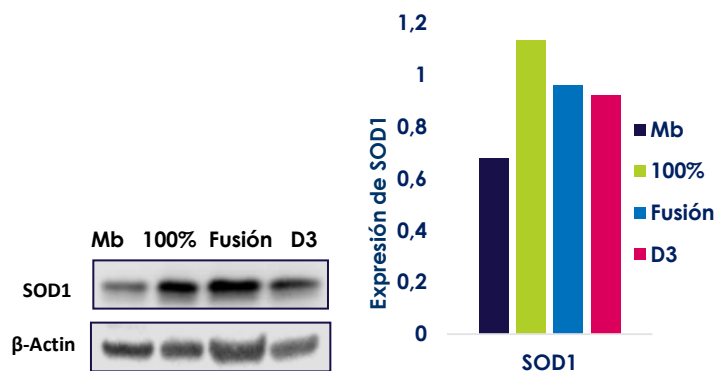


Figura 3.1 Aumento de la expresión de SOD1 durante la diferenciación cuantificado por Western blot. Mb (mioblasto), 100% (confluencia; miocito), Fusión (día 1; primeros miotubos), D3 (día 3; miotubos tempranos), (n=2).

Con respecto a TDP-43 y FUS, se ha investigado su expresión y localización celular mediante WB en muestras fraccionadas e inmunofluorescencia, con el objeto de poder analizar sus movimientos entre el núcleo y el citoplasma. En la inmunofluorescencia se marcan por un lado TDP-43 (rojo) y el marcador de miotubos MyHC (verde) y por otro lado FUS (verde) y MyHC (rojo). Los resultados del fraccionamiento celular indican que la separación del núcleo y el citoplasma se ha realizado correctamente ya que en el compartimento nuclear no se ha encontrado la proteína específica de citoplasma; tubulina, y en el citoplasma no se ha encontrado la proteína de unión a DNA; histona 3 (H3), salvo unas trazas en la fase de mioblastos. Los experimentos de WB muestran que la proteína TDP-43 se localiza en el núcleo durante el proceso

de diferenciación, pero su expresión aumenta en la fase de fusión y miotubo temprano, como muestra la cuantificación del Western blot (**figura 3.3**), contrariamente de lo que ocurre con el factor de transcripción FoxO3 que disminuye precisamente en estas fases (**figura 2.10 y 2.11**); y en el caso de FoxO1, que se localiza en el citoplasma durante la fusión (**figura 2.10 y 2.11**). De forma interesante, se puede observar en las imágenes la aparición de unos pequeños gránulos citoplasmáticos positivos para la proteína TDP-43 en los estadios D2 y D3 (día 2 y 3 de diferenciación tras el inicio de la fusión) (**figura 3.2 y 3.5**, puntas de flechas blancas); aunque esta sutil presencia de TDP-43 en el citoplasma no es detectable mediante la técnica de Western blot. El comportamiento de FUS durante la diferenciación celular muscular es diferente. En este sentido, el nivel de FUS nuclear es mayor en la fase de mioblasto que en el momento de fusión, lo cual puede ser debido a la translocación de FUS al citoplasma que se observa, tanto por inmunofluorescencia como por Western blot, en los fraccionamientos (**figura 3.2; 3.4; 3.5** puntas de flecha amarillas).

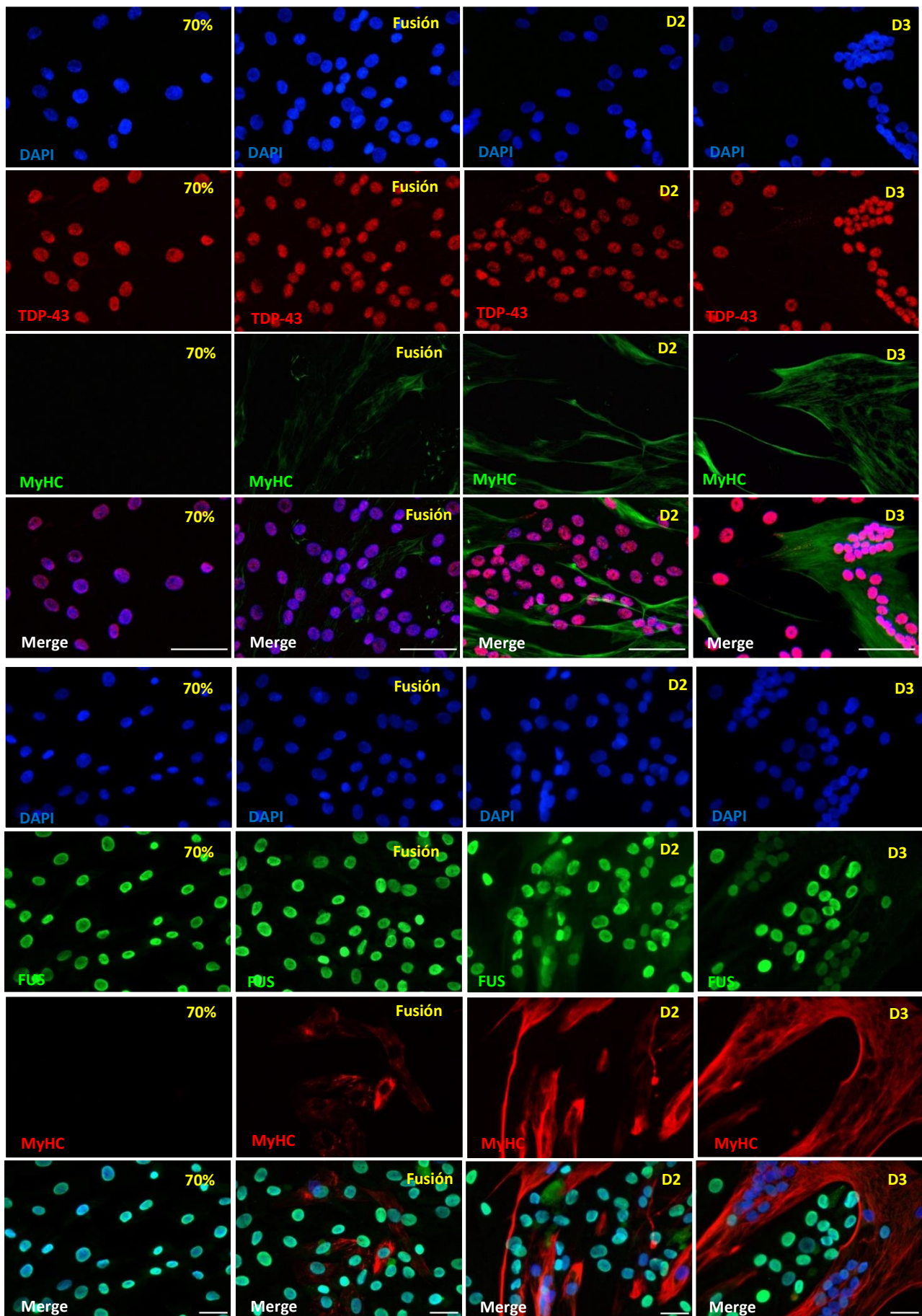


Figura 3.2. Localización celular de TDP-43 y FUS durante la diferenciación celular muscular. Inmunofluorescencia; TDP-43 (rojo)/MyHC (verde); FUS (verde)/MyHC (rojo). Estadios: 70% de confluencia, miocito-fusión (día 1 de diferenciación), D2 (día 2 de diferenciación) y D3 (día 3 de diferenciación, miotubos tempranos). Escala de la inmunofluorescencia de TDP-43 y FUS, 76 μ m y 38 μ m, respectivamente.

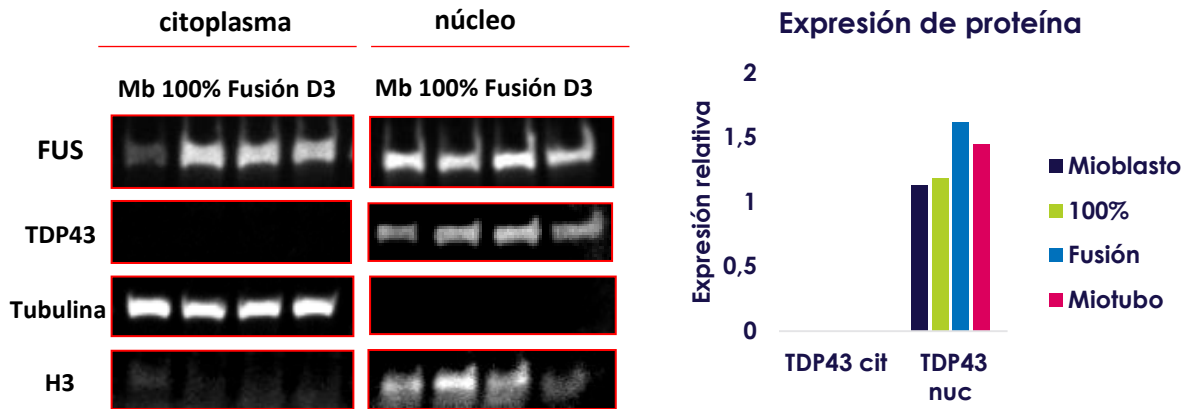


Figura 3.3. Análisis mediante WB de la localización de TDP-43 y FUS en los compartimentos celulares. Mb (mioblasto), 100% (confluencia; miocito), Fusión (día 1; primeros miotubos), D3 (día 3; miotubos tempranos), (n=2).

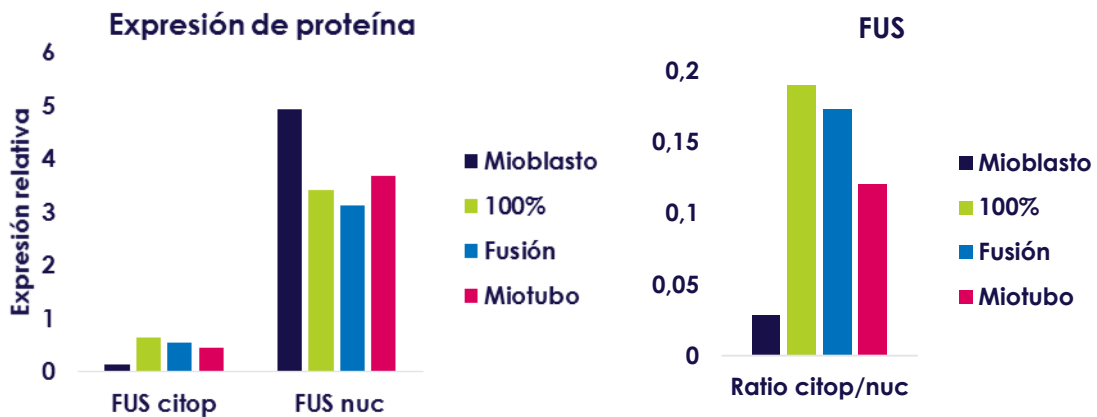


Figura 3.4. Análisis mediante WB de la localización FUS en los compartimentos celulares. Mb (mioblasto), 100% (confluencia; miocito), Fusión (día 1; primeros miotubos), D3 (día 3; miotubos tempranos), (n=2).

La diferencia más importante entre el comportamiento de FUS y TDP-43 durante el proceso de diferenciación miogénica radica en una mayor translocación citoplásmica de FUS que se produce en el momento de fusión en comparación con la de TDP-43 (figura 3.2; 3.3; 3.4; 3.5). De hecho, los niveles más altos de FUS en el citoplasma se corresponden con el punto justo antes de la fusión, a 100% de confluencia, que coincide con los niveles más bajos de FUS en el núcleo. En la figura 3.5 se ve nítidamente este fenómeno; los mioblastos sin fusionar tienen unos niveles más altos de FUS en el núcleo, en comparación de los miotubos MyHC positivos (rojo) que

presentan una clara disminución de FUS nuclear. Los niveles de FUS citoplásmico bajan desde la fase de confluencia completa hasta miotubo temprano, como se puede apreciar en la cuantificación por Western blot (**figura 3.4**), en la que mientras los niveles de FUS nuclear se mantienen similares a partir de esta fase, el *ratio* citoplasma/núcleo comienza a disminuir (**figura 3.4**).

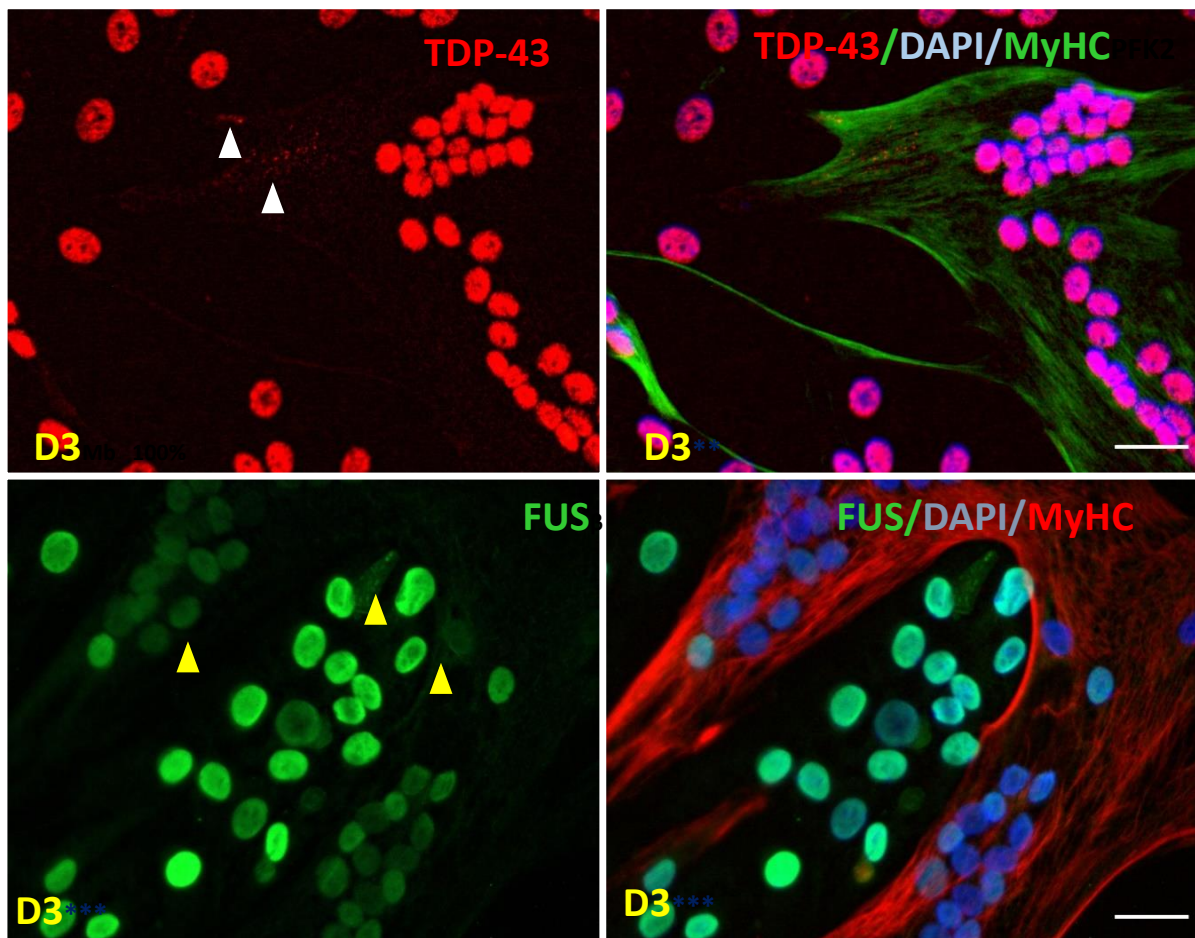


Figura 3.5. Localización celular de TDP43 y FUS durante la diferenciación celular muscular. Inmunofluorescencia; TDP-43 (rojo)/MyHC (verde); FUS (verde)/MyHC (rojo). Estadío D3 (día 3 de diferenciación, miotubos tempranos). Gránulos de TDP-43 (puntas de flecha blancas), translocación de FUS del núcleo al citoplasma (puntas de flecha amarillas). Escala 38 μ m.

3.2. Creación de un modelo celular para el estudio de los mecanismos patológicos asociados a la diferenciación celular muscular en relación con la ELA.

Se generaron modelos de inducción de pérdida de función de TDP-43, SOD1 o FUS a través del silenciamiento de dichos genes mediante partículas lentivirales con expresión de *short hairpin RNAs* (Sioud, 2010) en la línea de mioblastos humanos inmortalizados 8220.

Las líneas generadas van a ser llamadas de la siguiente manera: *wild-type*, refiere a células control sin infección con lentivirus; shRNA, refiere a células control de infección (con lentivirus sin carga genética silenciadora); shTDP43 refiere a células silenciadas para *TARDBP*; shSOD1 refiere a células silenciadas para *SOD1*; y shFUS refiere a células silenciadas para *FUS*. Tras tres días tras la infección, los mioblastos presentan un descenso significativo en comparación con el control shRNA, en los niveles de proteína TDP-43, SOD1 y FUS, con un silenciamiento significativo de cada una de ellas de 83%, 93% y 84% respectivamente (**figura 3.6**). Sorprendentemente existe una relación directa entre los tres genes, en tanto en cuanto, al silenciar TD-P43 y FUS los niveles de SOD1 aumentan de manera significativa (**figura 3.6**).

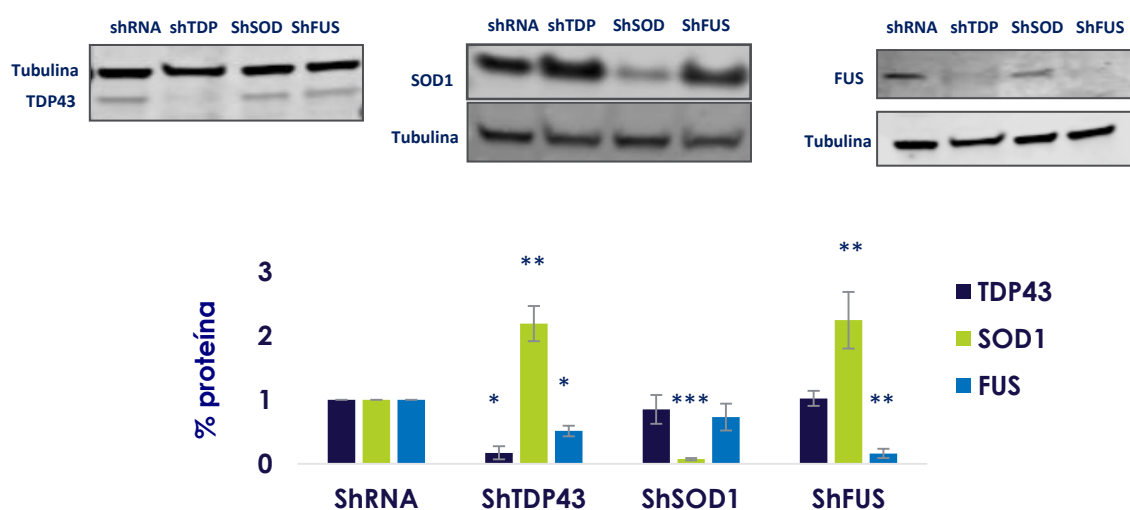


Figura 3.6. Análisis de expresión de las proteínas TDP-43, SOD1 y FUS en las líneas silenciadas mediante Western blot. Prueba t-Student *p<0,05. **p<0,01. ***p<0,001, (n=4).

Para poder corroborar si este aumento de SOD1 en las líneas shTDP43 y shFUS es debido a un mecanismo de compensación por un aumento del estrés oxidativo, los niveles del anión superóxido han sido medidos usando una sonda de fluorescencia con dihidroetidio (DHE) y citometría de flujo. Los resultados de este análisis indican que este aumento de expresión de SOD1 en estas líneas puede deberse al aumento de los niveles de ROS, con respecto al shRNA, en shTDP43 y shFUS. Como cabe esperar, el silenciamiento de *SOD1* produce los niveles más altos de radicales libres con respecto al resto de líneas (**figura 3.7**). Además, en esta ocasión, también se han medido los niveles de estrés oxidativo en la línea *wild type* para poder compararlos con el control del proceso de infección, shRNA, y comprobar cómo dicho proceso genera estrés oxidativo.

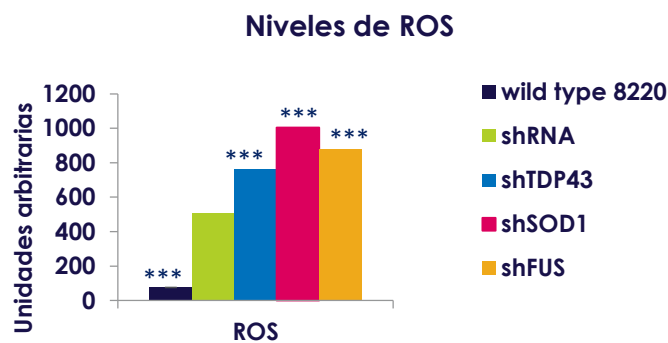


Figura 3.7. Cuantificación mediante sonda fluorescente (DHE) y citometría de flujo, los niveles celulares de ROS. Prueba t-student, *p<0,05. **p<0,01. *p<0,001, (n=3.10⁵ cels).**

Al silenciar *TARDBP* los niveles de FUS disminuyen significativamente, incluyendo así los efectos del silenciamiento de FUS dentro del silenciamiento de *TARDBP* (**figura 3.6**). Por ello se espera que la línea shTDP43 pueda tener parte de su fenotipo en común con la línea shFUS.

Para caracterizar la morfología y la estructura subcelular del silenciamiento de *TARDBP*, *SOD1* y *FUS* en mioblastos, se han observado las diferentes líneas a 40% de confluencia por microscopía óptica (**figura 3.8**) y por microscopía electrónica de transmisión (MET) (**figura 3.9**). Las imágenes de microscopía

óptica revelan diferencias consistentes en cuanto al tamaño y morfología de cada una de las líneas celulares silenciadas. En concreto, el tamaño celular en la línea shRNA es menor que el resto, sobre todo en comparación con las células shTDP43, las cuales presentan una morfología redondeada con un gran núcleo y nucleolos muy marcados (puntas de flecha rojas). Asimismo, los mioblastos deficientes en FUS tienen una morfología peculiar tipo fusiforme y son más largos (puntas de flecha azules).

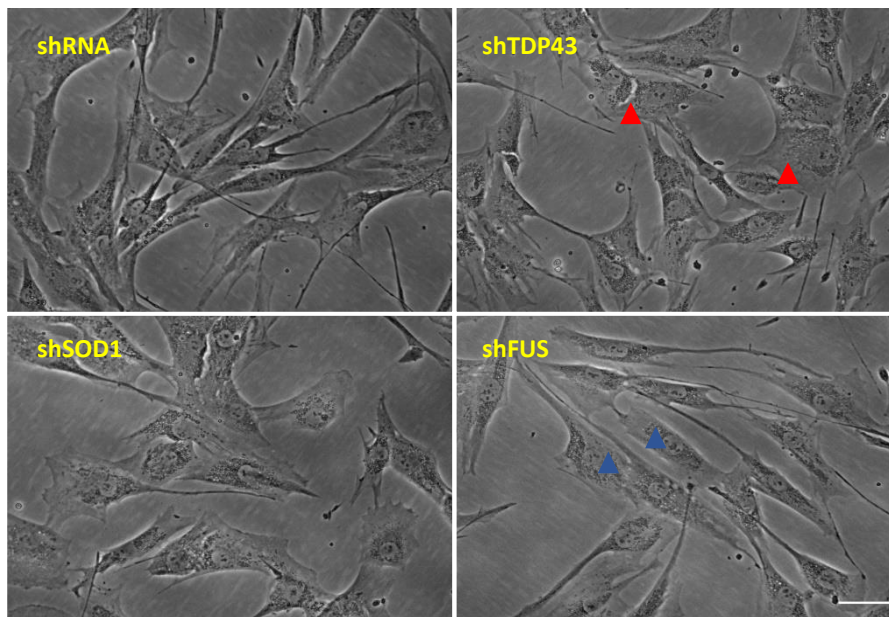


Figura 3.8. Imagen de microscopía óptica de las líneas silenciadas shRNA, shTDP43, shSOD1 y shFUS. Mioblastos shTDP43 grandes (puntas de flecha rojas), mioblastos shFUS largos y fusiformes (puntas de flecha azules). Escala 38 μm .

Al examinar la ultraestructura de las líneas celulares y al comparar con los mioblastos control shRNA, los mioblastos deficientes en TDP-43 exhiben un gran número de orgánulos alrededor del núcleo, con muchas mitocondrias fragmentadas, con un retículo endoplásmico rugoso (RER) muy corto y en la periferia, y con abundantes estructuras densas multilamelares vesiculares sugestivas de autofagolisosomas (puntas de flecha rojas). Igualmente, la línea shFUS presenta abundantes mitocondrias y autofagolisosomas pero con un RER largo y dilatado (puntas de flecha azules). En el caso de los mioblastos con silenciamiento del gen *SOD1*, el RER también está dilatado pero las

mitocondrias no presentan ninguna anomalía (puntas de flecha amarillas) (figura 3.9).

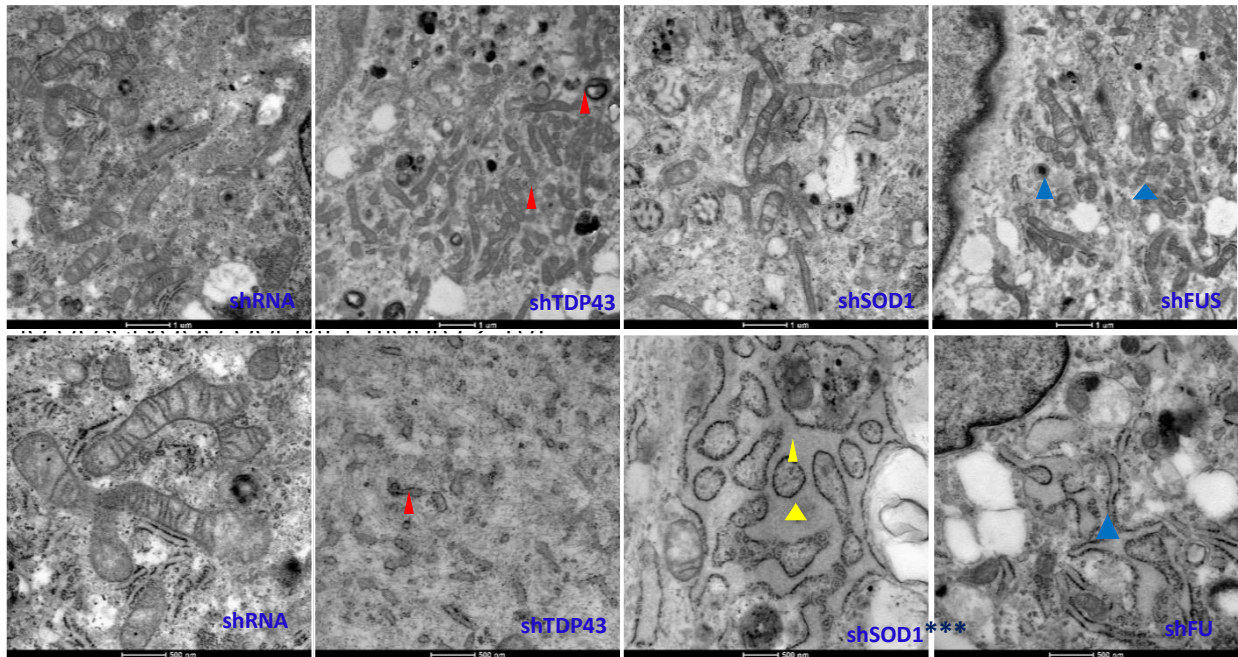


Figura 3.9. Ultraestructura de los mioblastos silenciados. Imagen de microscopía electrónica de transmisión (MET). Puntas de flecha rojas; shTDP43 (mitocondrias pequeñas y abundantes con RER corto). Puntas de flecha azules; shFUS (mitocondrias pequeñas y abundantes con RER dilatado). Puntas de flecha amarillas; shSOD1 (mitocondrias normales y RER muy dilatado). Escala 1 µm (fila de arriba) y 500nm (fila de abajo).

3.3. La pérdida de función de TDP-43, SOD1 o FUS produce deficiencias en la diferenciación muscular

Como muestra la figura 3.10, la velocidad de proliferación es menor en las líneas con deficiencia en TDP-43, SOD1 o FUS con respecto al control shRNA.

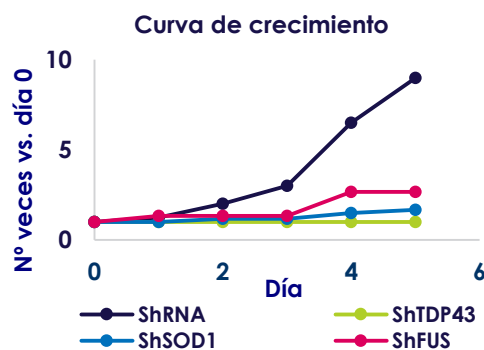


Figura 3.10. Curva de crecimiento. Múltiplo del número de células sembradas cada día del cultivo celular, (n=1).

Destaca la línea shTDP43 por ser la que presenta la tasa de recambio celular menor de todas las líneas.

Para estudiar el efecto del silenciamiento de *TARDBP*, *SOD1* y *FUS* en la diferenciación celular se han utilizado dos métodos de diferenciación miogénica diferentes: el inducido y el espontáneo. Los estadios de la diferenciación analizados son: confluencias 90% y 100%, día 1 de diferenciación (fusión) que es cuando aparecen los primeros miotubos en el control shRNA, día 2 de diferenciación. Inicialmente, se ha observado que, al igual que el proceso de infección en sí mismo genera un estrés oxidativo, como refleja la **figura 3.7**, también genera un pequeño retraso en el proceso de diferenciación. Este dato queda señalado en el punto en el que aparecen los primeros miotubos en el control shRNA; día 1 de diferenciación o fusión. En ese momento, el control *wild type*, que parte desde el mismo punto de 100% de confluencia, presenta miotubos de un tamaño mucho mayor que el shRNA (**figura 3.11**). Sin embargo, la pérdida de función de TDP-43, SOD1 o FUS resulta en una diferenciación celular deficiente, con particularidades para de cada línea. Mientras que en el protocolo de diferenciación espontánea las líneas shTDP43 y shFUS se mantienen viables durante 10 días, en el protocolo de diferenciación inducida, el medio de diferenciación provoca la muerte celular de los mioblastos deficientes en TDP-43 y FUS cuando alcanzan el 100% de confluencia (**figura 3.11**). No toleran bien el medio de diferenciación que acelera el proceso de diferenciación. Sin embargo, el control shRNA y shSOD1 toleran bien el medio de diferenciación, aunque en los mioblastos deficientes en SOD1, tanto como con medio de diferenciación como sin medio, aparecen miotubos con un gran número de núcleos por miotubo con una fusión aberrante. El control shRNA diferencia correctamente, aunque lo hace de forma más lenta que con el medio de diferenciación. Sin embargo, en shFUS aparecen los primeros miotubos de forma tardía, a partir del día 4 de diferenciación del control shRNA y son miotubos más estrechos y con menos núcleos por miotubo (**figura 3.12**). Los mioblastos deficientes en TDP-43 han perdido completamente la capacidad de diferenciación, pues no se observa ningún miotubo incluso a

día 8 post-confluencia 100% (**figura 3.13**). Por Lo tanto, el silenciamiento de *TARDBP* bloquea totalmente la diferenciación celular muscular. A la vista de estos resultados, se puede concluir que el silenciamiento de cualquiera de estos genes relacionados con ELA, produce un fenotipo común en mioblastos: pérdida de la capacidad espontánea de los mioblastos para fusionar y formar miotubos maduros *in vitro*.

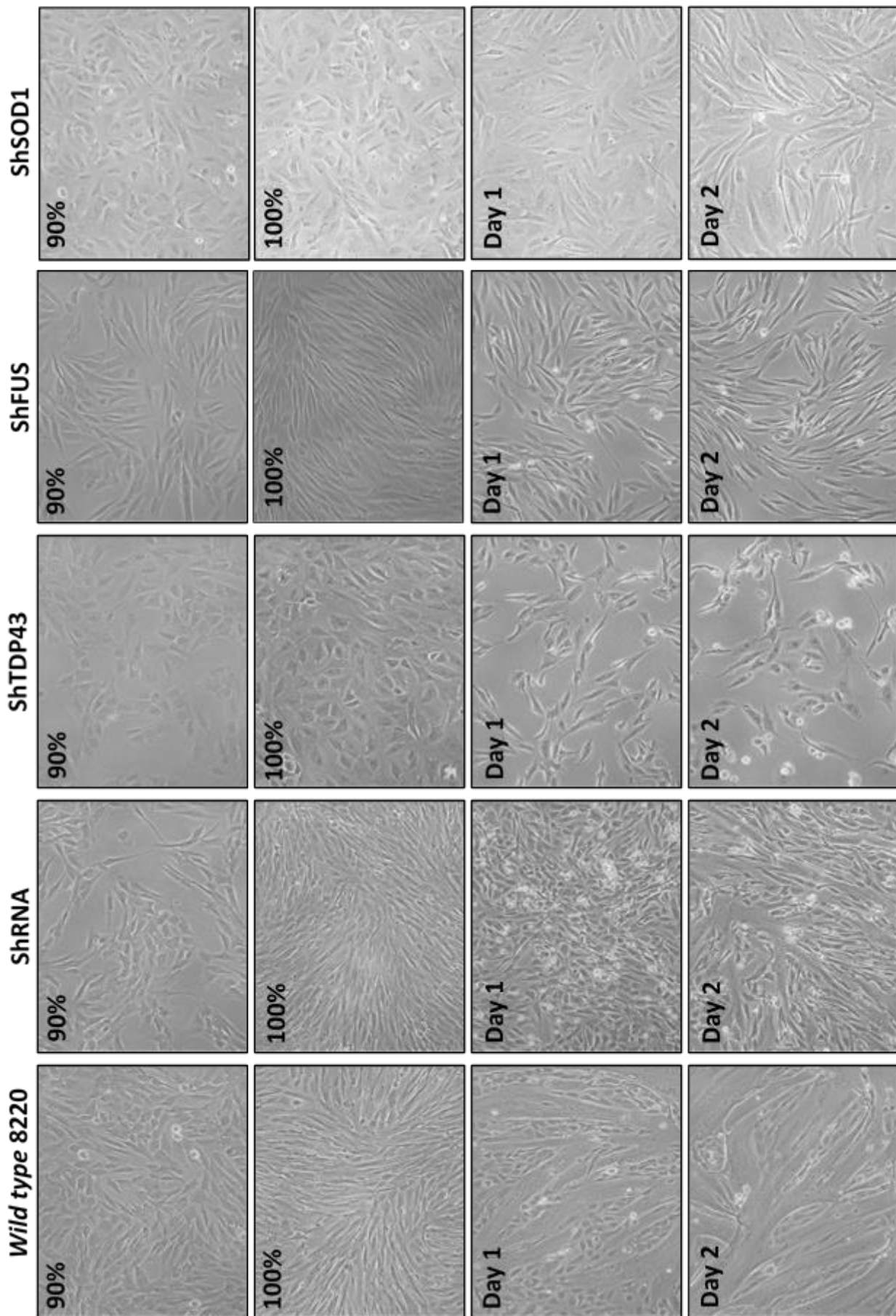


Figura 3.11 . Caracterización mediante microscopía óptica del proceso de diferenciación en los mioblastos *wild type*, shRNA, shTDP43, shSOD1 y shFUS en cultivo. Medio de diferenciación añadido a 100% de confluencia.

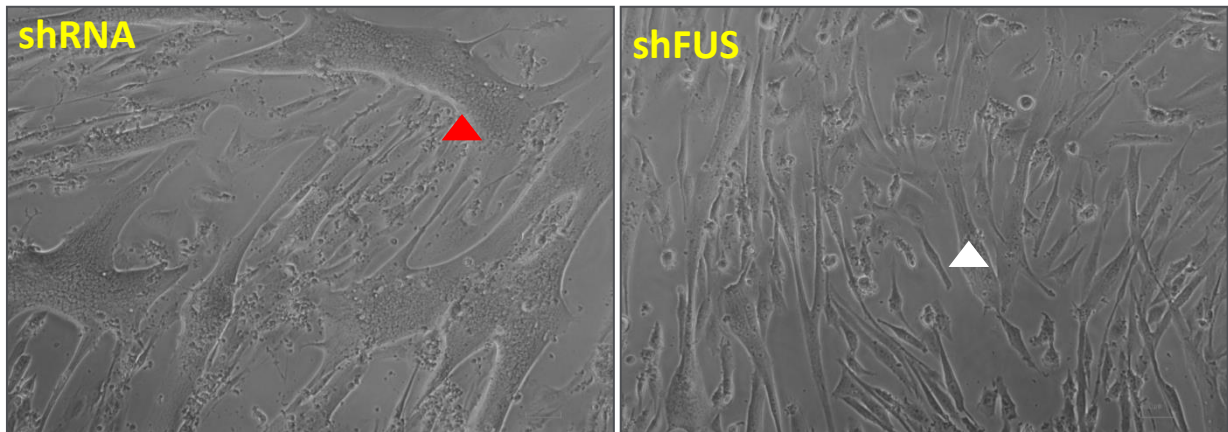


Figura 3.12. Inicio de la fusión en shFUS en el día 4 de diferenciación de los mioblastos control shRNA. Formación de miotubos más estrechos en shFUS (puntas de flecha blancas) con respecto al shRNA (puntas de flecha rojas).

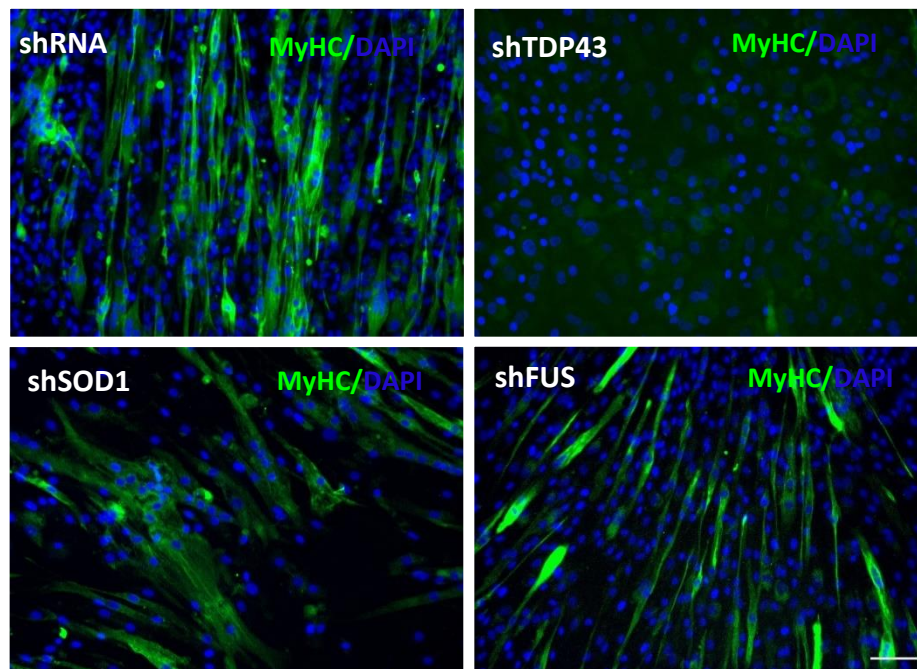


Figura 3.13. Defectos en la diferenciación celular en los mioblastos deficientes en TDP-43, SOD1 y FUS. Inmonofluorescencia del marcador de miotubos, MyHC (verde) y DAPI (azul) en cultivos sin medio de diferenciación, tras 8 días post-confluencia 100%. Incapacidad completa de shTDP43 de diferenciación. Formación de miotubos aberrantes en shSOD1 y miotubos estrechos en shFUS. Escala 38 μ m.

Se midieron los niveles de MyoD, el factor de transcripción que activa el proceso de diferenciación, MyoD. Los análisis de esta proteína por Western blot muestra que sus niveles están disminuidos de forma significativa en los mioblastos shTDP43 y shFUS (**figura 3.14, A**). En la línea shSOD1 existe variabilidad entre los diferentes ensayos y la diferencia de expresión de MyoD

con respecto a los mioblastos shRNA no es significativa, a pesar de que la diferenciación celular está afectada en este modelo de mioblastos. Sin embargo, las imágenes de inmunofluorescencia de MyoD confirman la disminución de los niveles nucleares de MyoD en los mioblastos deficientes en TDP-43 y FUS (**figura 3.14, B**).

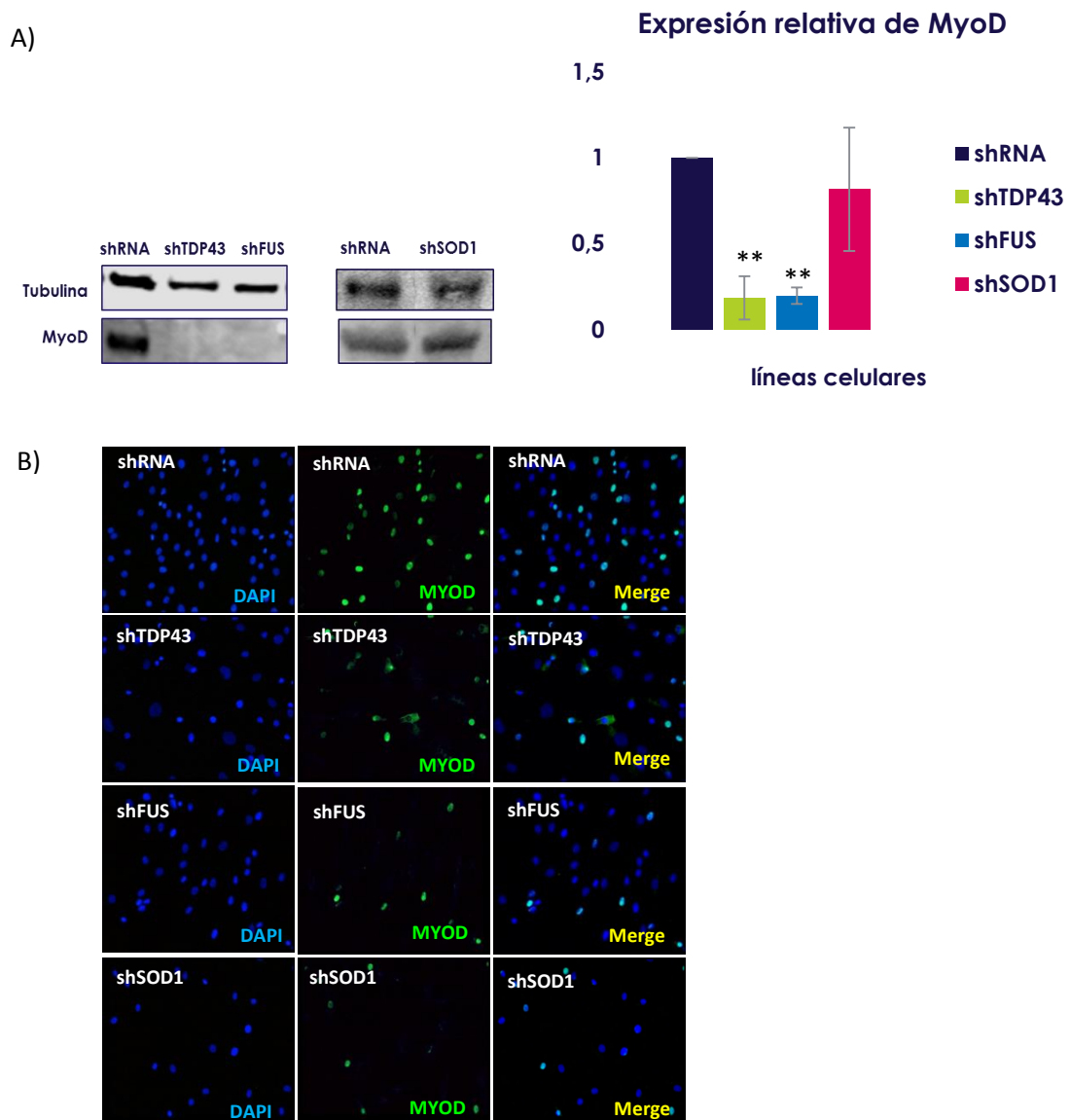


Figura 3.14. A. Expresión de MyoD analizada por Western blot en las líneas silenciadas con niveles significativamente más bajos en shTDP43 y shFUS con respecto a shRNA. Prueba t-Student, * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$, (n=3). B. Inmunofluorescencia de MyoD (verde) y DAPI (azul) de las líneas silenciadas.

3.4. Aumento de las proteínas pro-atrofia en los mioblastos deficientes de TDP-43 y FUS

Se sabe que la proteína Atroquina-1 (MAFbx) degrada el factor de transcripción MyoD, y que la expresión de ambas proteínas está inversamente relacionada durante el proceso de diferenciación celular. Además, la sobreexpresión de Atroquina-1 anula la diferenciación y formación de miotubos inducida por MyoD (Tintignac *et al.*, 2005). Se han estudiado los niveles de las proteínas pro-atrofia del sistema ubiquitin-proteosoma (Atroquina-1 y Murf-1) en los modelos de silenciamiento de *TARDBP* y *FUS*, en donde las alteraciones de la capacidad diferenciadora estaban acompañadas de una reducción significativa en los niveles de MyoD. Como cabía esperar, los mioblastos que tienen baja expresión de MyoD, shTDP43 y shFUS, presentan una sobre-expresión significativa de las proteínas pro-atrofia (**figura 3.15**), siendo este aumento superior en la línea shTDP43.

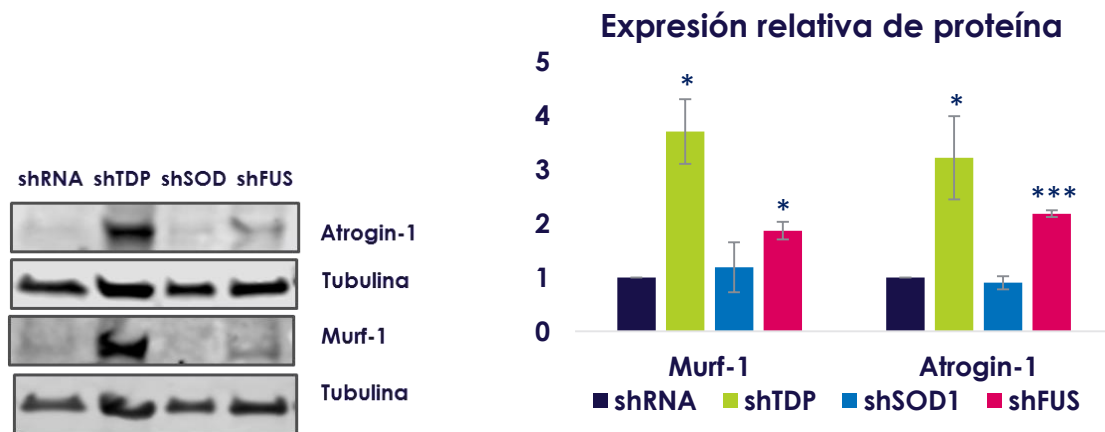


Figura 3.15. Sobreexpresión de las E3 ligasas, Atroquina-1 y Murf-1 en mioblastos silenciados en *TARDBP* y *FUS* medido por Western blot. Prueba t-Student, *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001, (n=3).

4. ANÁLISIS DE LA IMPLICACIÓN DE TDP-43, SOD1 Y FUS EN LA REGULACIÓN DEL METABOLISMO ENERGÉTICO MUSCULAR

En la presente investigación se ha demostrado que la diferenciación muscular es un proceso con demandas energéticas elevadas, que requiere de cambios en la dependencia de las diferentes vías de obtención de energía que son importantes para su correcto funcionamiento. En concreto, en el momento de alineación de miocitos (100% de confluencia), el metabolismo anaerobio es predominante y crucial para las fases de fusión, puesto que la inhibición de esta ruta metabólica bloquea el proceso de diferenciación a miotubo. Asimismo, esta inhibición de la glucólisis conlleva una disminución en la expresión de MyoD y un aumento de las proteínas del sistema ubiquitín-proteasoma. Por otra parte, la propia inhibición glucolítica produce un estrés en la célula que conduce al aumento de expresión y translocación nuclear de los factores de transcripción FoxO1 y FoxO3. En esta situación de estrés metabólico por represión glucolítica, la actividad transcripcional de dichos factores se activa y provoca un aumento en los niveles de las proteínas pro-atrofia del sistema ubiquitín-proteasoma y una disminución de MyoD.

Aunque fragmentarias, hay evidencias científicas que ponen de manifiesto la existencia de una defectuosa diferenciación muscular en pacientes con ELA, tal y como se ha explicado anteriormente en este trabajo. Esto motivó la investigación de la posible implicación de TDP-43, SOD1 y FUS en dicho proceso muscular, con los cambios tanto en expresión como en localización durante la diferenciación de las proteínas que codifican. Se pudo observar que el silenciamiento de cada uno de los genes por separado, condujo a un efecto común; la pérdida de la capacidad de fusionar y de diferenciarse los mioblastos a miotubos. Asimismo, tanto la expresión de la MyoD como de las proteínas pro-atrofia, siguen el mismo patrón de cambio en los mioblastos deficientes en TDP-43 y en FUS que en los mioblastos *wild type*, cuando se inhibe la glucólisis con 2-dg. Por eso, en este punto del estudio, se ha procedido a investigar el efecto del silenciamiento de los genes ELA en

mioblastos sobre el metabolismo energético en general y, en mayor profundidad, sobre el metabolismo anaerobio y sus sistemas regulatorios; la lanzadera de glicerol, la lanzadera de malato-aspartato, el bombeo de esqueletos carbonados de la mitocondria al citosol y la glutaminolisis.

4.1. La pérdida de función de TDP-43, SOD1 o FUS en mioblastos humanos afecta a la actividad metabólica celular

Para examinar el efecto del silenciamiento de *TARDBP*, *SOD1* y *FUS* sobre el metabolismo energético se ha utilizado la técnica de análisis de flujo bioenergético mediante *Seahorse XF Analyzer* que mide el parámetro ECAR (ΔH^+) y OCR (O_2 consumido) en diferentes condiciones, que corresponden a la actividad glucolítica y mitocondrial, respectivamente. Con respecto a la glucolisis, su valor se obtiene al añadir glucosa a altas concentraciones en el medio. De esta manera, se activan las enzimas reguladas por los niveles de glucosa y con ello la vía anaeróbica. Sin embargo, no todo el metabolismo va a ser anaerobio, por eso, para conocer la capacidad glucolítica celular total se inhibe la mitocondria con oligomicina y el valor obtenido corresponde a la respuesta celular únicamente en base a la glucolisis. Por lo tanto, al añadir glucosa en el medio se mide la glucolisis dependiente de los niveles de glucosa y al añadir posteriormente oligomicina se obtiene la capacidad glucolítica total. Cada una de las líneas de mioblasto con silenciamiento en *TARDBP*, *SOD1* y *FUS* presentan deficiencias significativas tanto en la glucolisis basal como en la capacidad glucolítica con respecto al control, aunque estos parámetros están particularmente disminuidos en la línea con silenciamiento en *TARDBP* (**figura 4.1**). Sólo la línea con silenciamiento en *FUS* presenta defectos en la reserva glucolítica en respuesta al bloqueo de la respiración mitocondrial, sugiriendo que los cambios en la capacidad máxima glucolítica provocados por el silenciamiento de *FUS* se explican en gran medida por una incapacidad de la respuesta glucolítica frente al colapso mitocondrial y no exclusivamente por los defectos en la glucolisis basal, como sucede en las líneas *shTDP43* y *shSOD1*. En general, con

estos datos replicados en más de 10 ensayos diferentes, se puede confirmar que el silenciamiento de *TARDBP*, *FUS* y *SOD1*, aunque en diferentes grados, afecta a la actividad glucolítica.

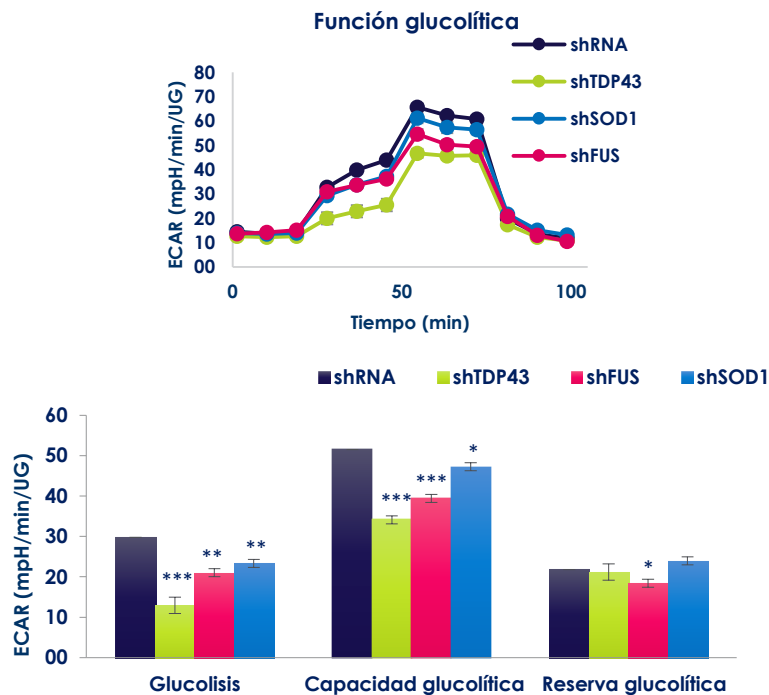


Figura 4.1. Disminución de la glucolisis y de la capacidad glucolítica en mioblastos deficientes en TDP43, FUS y SOD1 dada por el parámetro ECAR mediante la técnica del Seahorse. Prueba t-Student, * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$, (n=6).

Con respecto a la actividad mitocondrial, los tres modelos de silenciamiento presentan defectos consistentes en la respiración (o consumo de oxígeno) basal (**figura 4.2**). Cuando se genera un estrés celular al añadir oligomicina, el consumo de O_2 disminuye debido a la inhibición de la ATPsintasa o complejo V de la cadena respiratoria. Esta inhibición bloquea la síntesis de ATP y el valor de O_2 consumido en este punto corresponde al que se destina precisamente para la síntesis de ATP. Los valores de ATP mitocondrial son significativamente más bajos en los tres silenciamientos por separado con respecto al control (**figura 4.2**). Otro parámetro fundamental que relaciona la capacidad respiratoria con la síntesis de ATP es el “*coupling efficiency*” o eficacia de acoplamiento. El hecho de que las mitocondrias respiren no

significa que este consumo de O_2 sea eficiente o que el rendimiento en obtener ATP sea alto. De hecho, elevados consumos de O_2 pueden estar sujetos a un desacople mitocondrial que impide la síntesis de ATP y que viene indicado por el parámetro “*proton leak*”. En las líneas shTDP43, shFUS y shSOD1 la eficacia de acoplamiento es significativamente menor que en el control shRNA (**figura 4.2**). Los cambios en estos tres parámetros generan una base racional suficiente para considerar que la eficiencia energética de las mitocondrias se encuentra alterada tras el silenciamiento de cualquiera de los genes ELA estudiados.

Cuando se activa la entrada de protones desde el espacio intermembrana a la matriz mitocondrial mediante el desacoplante FCCP, la cadena respiratoria vuelve a consumir O_2 por la reactivación de las reacciones de oxidorreducción de los complejos interrumpidas por el bloqueo de la ATPsintasa. Esta activación desbloquea este flujo electrónico y produce un aumento en el consumo de O_2 que se corresponde con el parámetro “*spare respiratory capacity*”, un indicador del consumo máximo de O_2 en condiciones óptimas de la cadena respiratoria. Contrario a los efectos en los anteriores parámetros, los efectos del silenciamiento de los tres genes ELA sobre el “*spare respiratory capacity*” son variables, observándose un aumento dramático de dicho parámetro en la línea shTDP43, a la vez que una disminución en la línea shFUS, respecto a la línea control shRNA (**figura 4.2**).

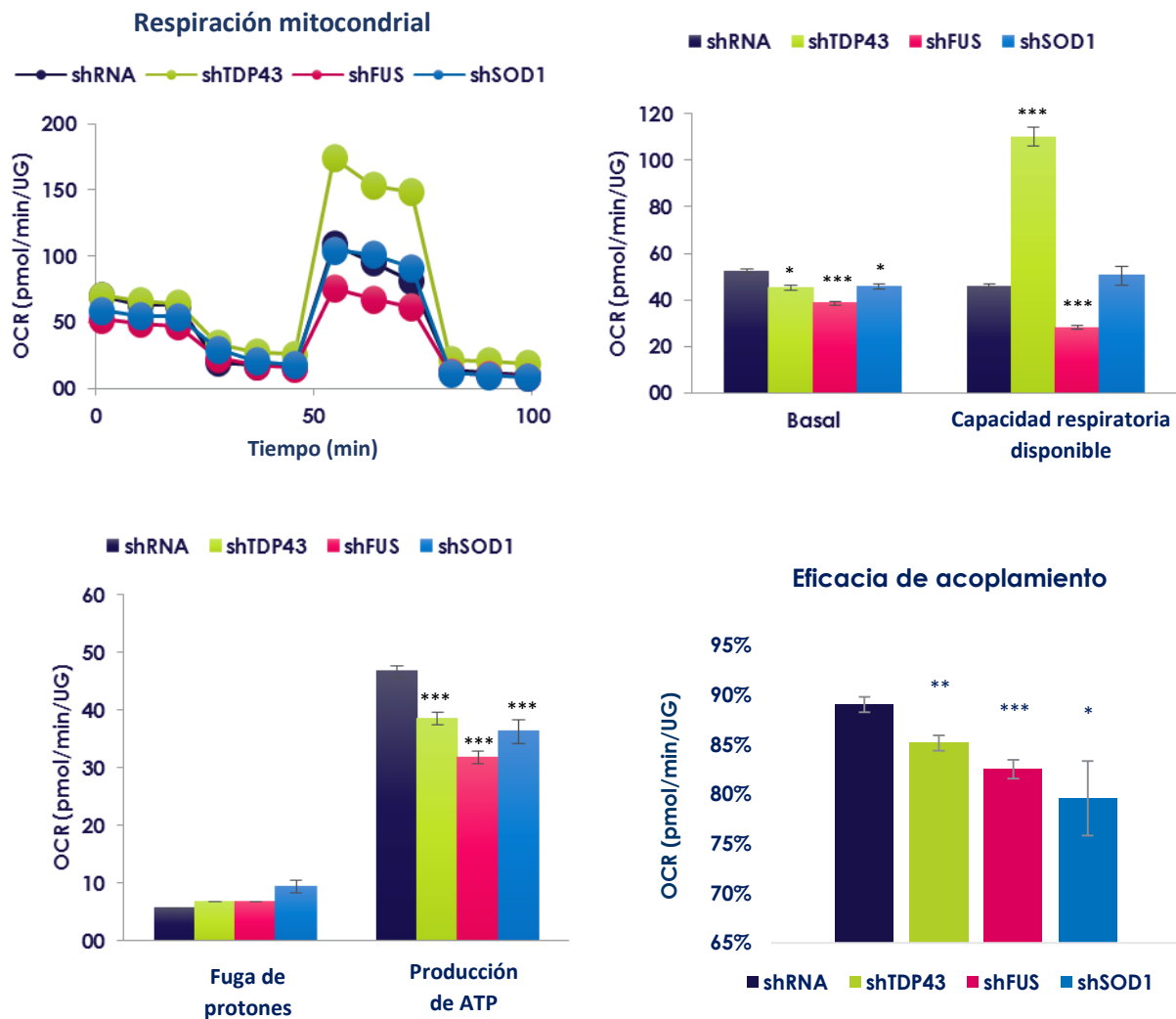


Figura 4.2. Caracterización de la actividad mitocondrial en los mioblastos silenciados. La producción de ATP y la eficacia de acoplamiento mitocondrial están disminuidos en todas líneas con respecto al control shRNA. Prueba t- Student, (n=6) *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001.

En la **figura 4.3** se puede apreciar la utilización relativa del metabolismo aerobio y anaerobio como reflejo de los niveles de ATP que se obtienen de la glucólisis con respecto al ATP mitocondrial. Las líneas shTDP43, shFUS y shSOD1 presentan unos valores más bajos de ATP glucolítico con respecto al control shRNA. Aun así, las líneas de mioblastos silenciados presentan un predominio del metabolismo glucolítico anaerobio, a pesar de encontrarse disminuido, sobre el oxidativo, al igual que lo observado anteriormente en mioblastos *wild type*.

Con el parámetro “ATP Rate Index” se pueden detectar diferencias en el fenotipo metabólico de las células. Este parámetro se obtiene del *ratio* del ATP mitocondrial respecto al glucolítico. Un aumento en este índice representa un metabolismo más oxidativo o menos glucolítico. Tanto los mioblastos con silenciamiento de *TARDBP* como de *FUS*, tienen índices de producción de ATP significativamente más elevados que el control. Esto indica que, aunque los valores de ATP sean más bajos en las líneas shTDP43 y shFUS, la proporción de ATP mitocondrial con respecto a la glucolítica es significativamente mayor y, en consecuencia, se puede inferir que el fenotipo metabólico inducido por el silenciamiento de TDP-43 o FUS es más oxidativo.

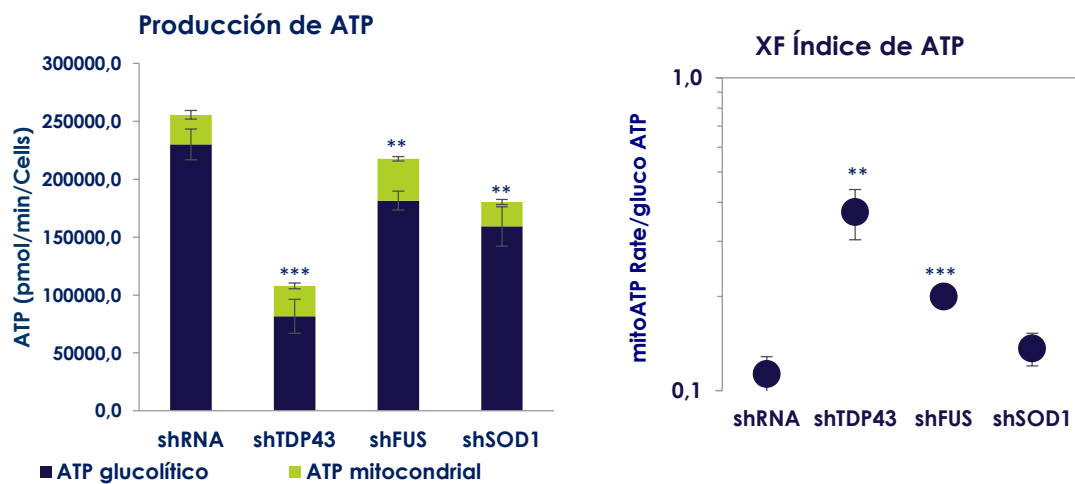


Figura 4.3. Análisis del fenotipo metabólico en los mioblastos silenciados. Los mioblastos deficientes en TDP-43 y FUS son más oxidativos que glucolíticos en comparación con la línea control shRNA. Prueba t-test, *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001, (n=6).

Estos resultados se pueden relacionar con los datos ultraestructurales obtenidos mediante microscopía electrónica de transmisión (**figura 3.9**), en los que se observa un aumento del número de mitocondrias en las líneas shRDP43 y shFUS. En este contexto, la proteína PGC1- α , codificada por el gen *PPARGC1A* (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*), un factor principal en la regulación de la biogénesis de mitocondrias (Valero, 2014), se encuentra sobreexpresada, de manera significativa, en los mioblastos con silenciamiento de *TARDBP* (**figura 4.4**).

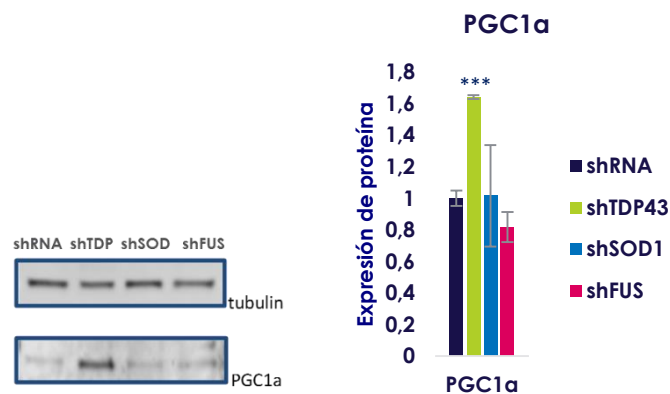


Figura 4.4. Sobreexpresión de PGC1a en los mioblastos deficientes en TDP-43 con respecto al control shRNA cuantificado por Western blot. Prueba t-student * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$, (n=3).

4.2. Análisis enzimático y metabólico de la maquinaria de oxido-reducción del NAD⁺ en mioblastos con silenciamiento en genes ELA

La glucólisis está regulada por la actividad de las enzimas que catalizan las reacciones irreversibles, como la hexoquinasa (HK), las fosfofructoquinasa 1 (PFK1), la fosfofructoquinasa 2 (PFK2) y la piruvato quinasa (PK), así como por la homeostasis del nicotinamin adenin dinucleótido citosólico (NAD⁺). El NAD⁺ citosólico actúa como cofactor de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, el ciclo del ácido tricarboxílico y la fosforilación oxidativa, participando en múltiples reacciones de óxido-reducción (redox) en las células. Los niveles NAD⁺ se controlan mediante un equilibrio entre la actividad de las enzimas sintetizadoras y consumidoras de NAD⁺ (Aksoy *et al.*, 2006; Bai *et al.*, 2011; Imai and Yoshino, 2013; Stromsdorfer *et al.*, 2016; Yoshino, Baur and Imai, 2018; Yoshino *et al.*, 2011, 2017). La regeneración de NAD⁺ proviene de: la lanzadera de glicerol, la lanzadera de malato-aspartato, el bombeo de esqueletos carbonados de la mitocondria al citosol y la glutaminólisis (figura 4.5).

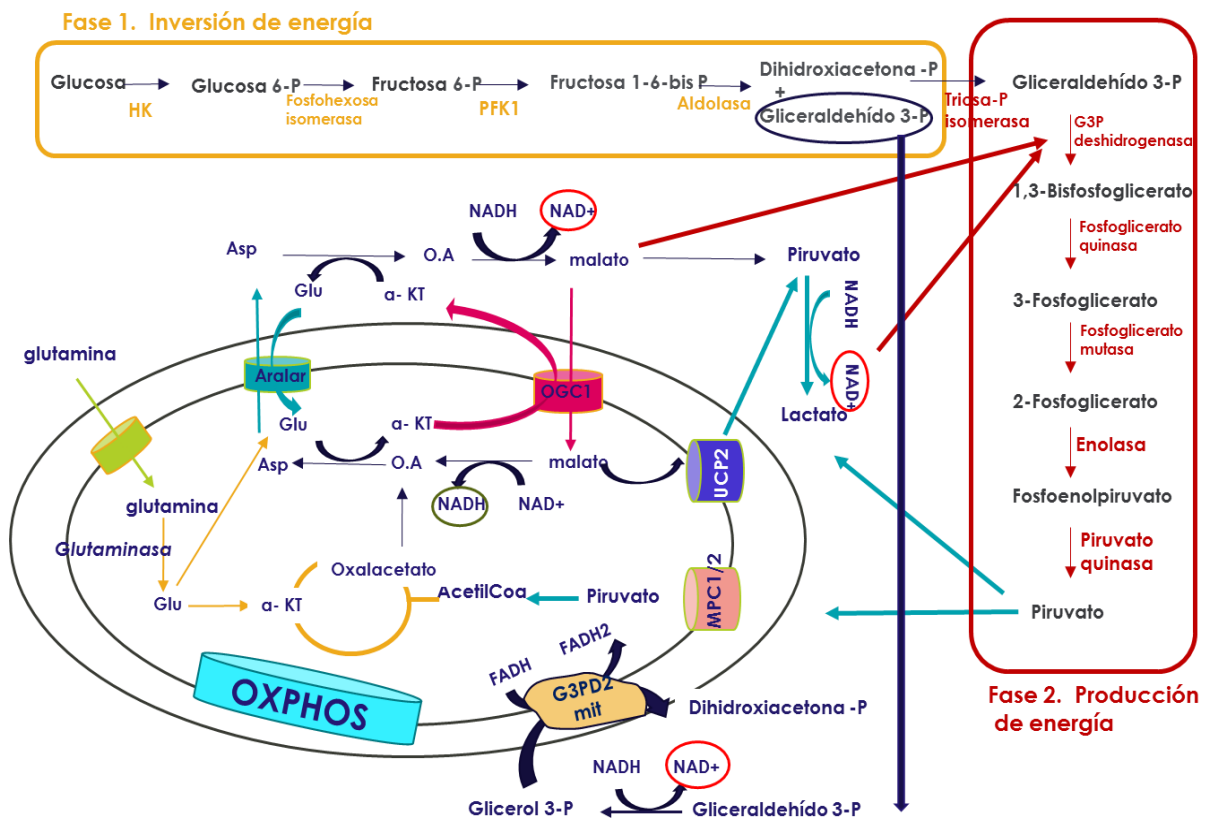


Figura 4.5. Resumen de las diferentes reacciones del metabolismo energético y su regulación.

Uno de los principales factores endógenos que regulan el flujo glucolítico en el citosol es la concentración citosólica de NAD⁺, en el sentido de que una disminución en los niveles de este nucleótido compromete la oxidación anaerobia de la glucosa.

Se han cuantificado la expresión de las enzimas glucolíticas y las enzimas de los sistemas de regeneración de NAD⁺ para tratar de encontrar una explicación a la reducción glucolítica provocado por el silenciamiento de los genes ELA. Como se observa en la **figura 4.6**, los enzimas glucolíticos que cambian su expresión al silenciar *TARDBP*, *SOD1* y *FUS* son: Hexoquinasa 2 (HKII), que aumenta significativamente en la línea shFUS; Piruvato quinasa muscular, que aumenta significativamente en la línea shTDP43; PFK1 (muscular), que aumenta en las líneas shTDP43 y shFUS y que disminuye significativamente en shSOD1; y PFK2, la enzima reguladora por excelencia de la glucolisis, que disminuye en todas las líneas silenciadas aunque lo hace significativamente en mioblastos defectivos en TDP-43 y SOD1.

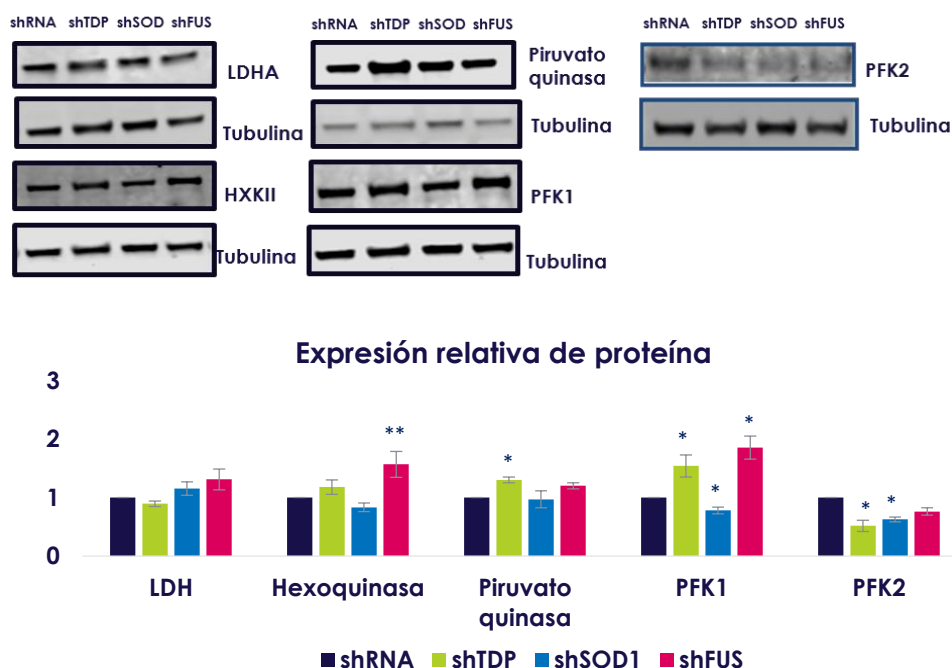


Figura 4.6. Análisis de expresión de enzimas glucolíticas mediante Western blot en los mioblastos silenciados con respecto al control de la infección, shRNA. Prueba t-Student * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$, (n=3).

Por otra parte, los niveles de expresión génica muestran valores significativos en algunas de las enzimas: aumento de PFKM (PFK1) en los mioblastos defectivos en TDP-43 y FUS por separado; aumento de HK2 y MPC1 (*mitochondrial pyruvate carrier 1*), transportador mitocondrial de piruvato, en el silenciamiento de FUS; otras enzimas metabólicas como la UCP2, disminuida por el silenciamiento de SOD1 y la UCP3, aumentada en los mioblastos defectivos en TDP-43 (**figura 4.7**). Los niveles proteicos de algunas de las enzimas que codifican estos genes, no concuerdan con los valores de expresión en mRNA, pudiendo encontrarse comprometida la fase de traducción de proteína con el silenciamiento de los genes *TARDBP*, *FUS* y *SOD1*. Por ejemplo, los niveles de expresión de ARNm que codifica a PFK2 no cambian en la línea shTDP43 y shFUS, con respecto al control shRNA, pero sus niveles proteicos son más bajos significativamente, en dichas líneas (**figuras 4.6 y 4.7**).

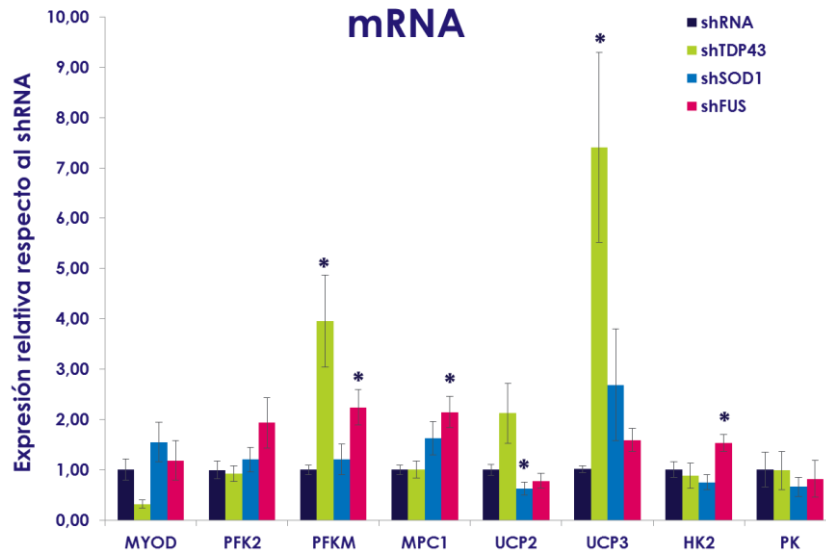


Figura 4.7. Análisis de expresión de mRNA mediante qPCR. Prueba t-student, *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001, (n=3).

El funcionamiento adecuado de las enzimas de los sistemas lanzadera proporciona la homeostasis de NAD⁺/NADH tanto en el citosol como en la mitocondria. Si una de estas enzimas falla, la lanzadera se desequilibra y los metabolitos que forman parte de este sistema modifican su concentración teniendo repercusión directa en el NAD⁺ citosólico.

La lanzadera de glicerol es el sistema regenerador de NAD⁺ más importante de las fibras musculares anaeróbicas. Esto es debido a que su velocidad de recuperación del NAD⁺ citosólico es mayor que en los otros sistemas lanzadera porque se produce una única reacción bioquímica en el citoplasma y otra en el espacio intermembrana. Estas reacciones están catalizadas por la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, G3PD1 (citosólica) y la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa 2, G3PD2 (mitocondrial). Los mioblastos deficientes en TDP-43 tienen una disminución muy significativa de la enzima citosólica (G3PD1), lo que explica la alteración glucolítica tan marcada de esta línea.

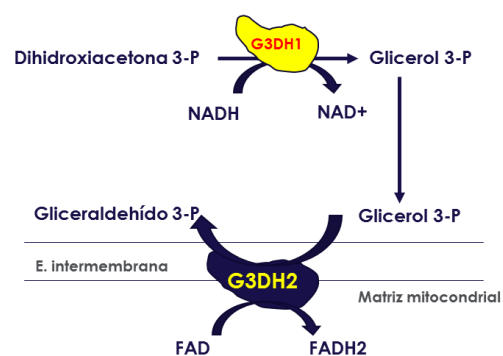


Figura 4.8. Esquema de la lanzadera de glicerol.

La enzima mitocondrial, G3PD2, no presenta cambios significativos en ningún silenciamiento (**figura 4.9**).

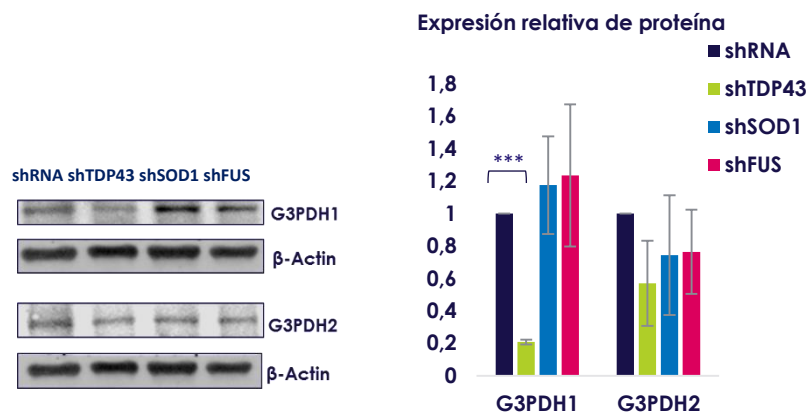


Figura 4.9. Cuantificación de las enzimas de la lanzadera de glicerol mediante Western blot en las líneas silenciadas. La línea shTDP43 presenta un descenso muy significativo de la enzima G3PDH1 con respecto al control. Prueba t-Student, *p<0,05 **p<0,01 *p<0,001, (n=3).**

La lanzadera de malato-aspartato está compuesta por varias enzimas: dos transportadores que actúan en antiporte: AGC1/Aralar1 (*aspartate glutamate carrier 1*) y OGC1 (*2-oxoglutarate carrier 1*). Aralar1 es responsable de transportar el glutamato y el aspartato en contracorriente, es decir, introduce glutamato a las mitocondrias y expulsa aspartato. Por el contrario, OGC1 saca α -cetoglutarato al citosol e introduce malato en las

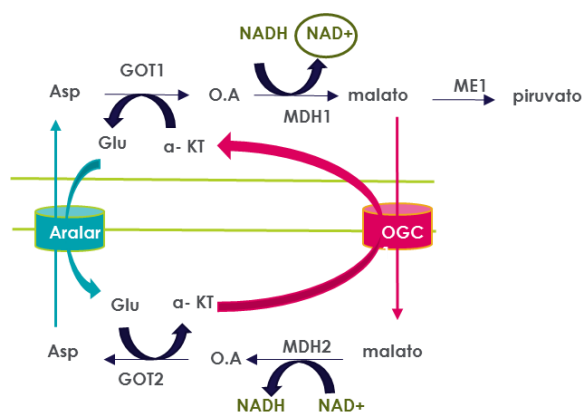


Figura 4.10. Esquema de la lanzadera de malato-aspartato.

mitocondrias.

Varias enzimas completan el sistema: GOT1 y MDH1, siendo isoenzimas citosólicas, y GOT2 y MDH2, mitocondriales. Las enzimas citosólicas recuperan el NAD^+ a expensas del consumo de $NADH$. Por otro lado, están los enzimas málicos ME1 y ME2, dependientes de $NAD(P)^+$ para

la biosíntesis de ácidos grasos, que actúan transformando el malato en piruvato en el citosol y en la mitocondria respectivamente.

Otras enzimas que participan, aunque indirectamente, en la lanzadera malato-aspartato son la UCP2 (*uncoupling protein 2*) y el transportador MPC1 (*mitochondrial pyruvate carrier 1*). La UCP2 regula la salida de esqueletos carbonados de cuatro carbonos (4C), como el malato y el exalacetato, y la MPC1 regula la entrada de piruvato a la mitocondria. Ambas actividades conllevan una reducción en la fermentación láctica catalizada por la enzima lactato deshidrogenasa A (LDHA). Por último, la glutaminólisis, mediada por la glutaminasa, también participa indirectamente en la lanzadera malato-aspartato. Esto sucede al transformar la glutamina en glutamato que luego se incorpora a la lanzadera. En cuanto a la expresión de todas estas enzimas, los mioblastos con silenciamiento de TDP-43 son los que más cambios presentan; disminuye significativamente la expresión de OGC1, las enzimas citosólicas GOT1, MDH1 y ME1 y aumenta la glutaminasa y MPC1. Asimismo, es muy significativa la reducción del transportador UCP2, lo que podría comprometer la salida de los esqueletos carbonados de 4C de la mitocondria. El silenciamiento de FUS provoca la sobreexpresión de MPC1 y la reducción de las enzimas citosólicas GOT1, MDH1 y ME1. Por el contrario, la línea shSOD1 muestra un patrón diferente con un aumento significativo de UCP2 y MDH2 (**figura 4.11**).

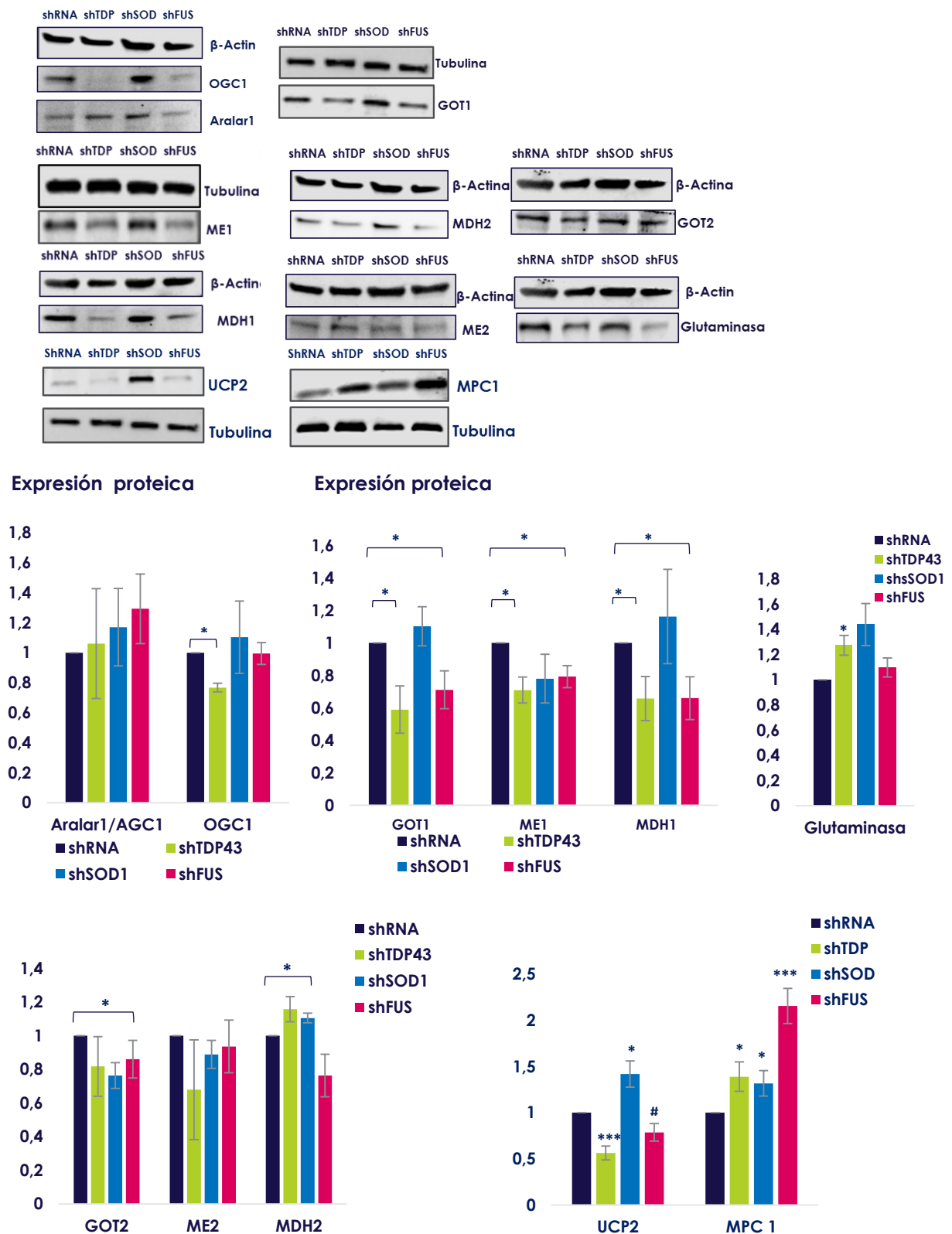


Figura 4.11. Cuantificación de la expresión enzimática en las líneas silenciadas mediante Western blot. Las enzimas estudiadas son las que participan en la lanzadera malato-aspartato, en la entrada de piruvato a la mitocondria, en la salida de los esqueletos carbonados de 4C y la glutaminólisis. Prueba t-Student, *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001, #p< 0,1 (n=4).

Para estudiar la funcionalidad de las lanzaderas se han medido metabolitos intermedios mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS), y mediante resonancia magnética nuclear (^1H -RMN). Por problemas técnicos no se han podido detectar los niveles de los metabolitos de la lanzadera de glicerol. Sin embargo, se han podido detectar y cuantificar por ambas técnicas los metabolitos que participan en la lanzadera de malato-aspartato. Estos metabolitos son: glutamato (Glu), aspartato (Asp) y glutamina (Gln). Para disminuir la variabilidad intra-sujeto y aportar medidas más fiables de los flujos metabólicos, se han representado los *ratios* en lugar de los valores absolutos. A partir de los datos obtenidos HPLC-MS, se observa que el *ratio* Glu/Asp es significativamente menor en la línea shTDP43 con respecto al control de la infección. Este aumento puede ser consecuencia de valores elevados de Asp o de valores bajos de Glu. Por otro lado, para analizar el valor de Glu, es necesario tener en cuenta la actividad de la glutaminolisis mediante el cálculo del *ratio* Glu/Gln. En el caso de la línea shTDP43, que presenta valores significativamente elevados de la glutaminasa, cabría esperar que los valores de Glu fueran altos y con ello, el *ratio* Glu/Asp elevado. Sin embargo, los niveles de Asp son significativamente muy altos con respecto al control. Esto concuerda con la disminución en la línea shTDP43 de las enzimas consumidoras de Asp (MDH1, GOT1) y el transportador OGC1, que bombea el reactivo necesario para dichas reacciones; el α -cetoglutarato. Esto podría explicar los niveles de Asp tan elevados en esta línea. El *ratio* Glu/Asp se ve afectado en la línea shFUS en la misma dirección y orden que en la línea shTDP43. Sin embargo, los valores de Glu son más bajos. Estos niveles de Glu concuerdan con el hecho de que la actividad de la enzima glutaminasa sea menor, como refleja el *ratio* Glu/Gln. En respecto a la línea shSOD1 el *ratio* Glu/Gln refleja una actividad glutaminasa disminuida (**figura 4.12**). Los cambios en los *ratios* metabólicos observados no varían considerablemente cuando se calculan a partir de los datos obtenidos mediante ^1H -RMN, aportando consistencia a los resultados.

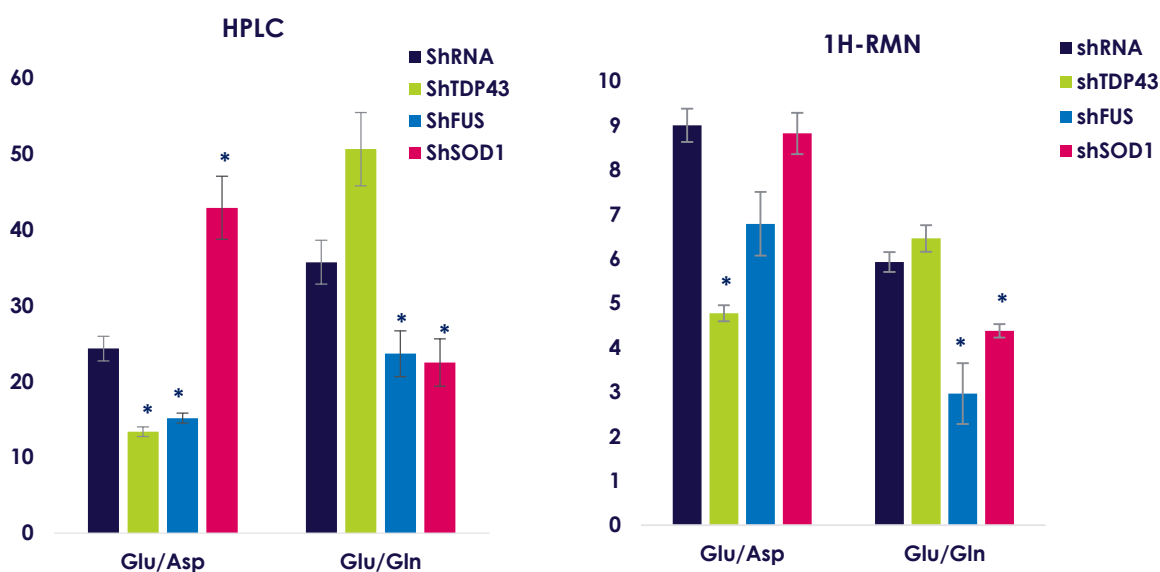


Figura 4.12. Análisis metabólico de la lanzadera de malato-aspartato, mediante HPLC-MS y $^1\text{H-RMN}$. Prueba t-Student, * $p<0,05$ ** $p<0,01$ *** $p<0,001$ (n=4).

4.3. Translocación de Los factores de transcripción FoxO al núcleo en modelos humanos de mioblasto con silenciamiento de *TARDBP*, *SOD1* y *FUS*

La familia de factores de transcripción FoxO incluye a los factores foxO1, FoxO3 y FoxO4, todos ellos expresados en músculo esquelético. Estos factores funcionan como interruptores de las vías de señalización de ciertos factores tróficos, tales como, la de la insulina, la del factor de crecimiento, IGF-1, y de la vía del TGF- β , regulando el programa transcripcional que controla funciones celulares tan importantes, como: la longevidad, la lipogénesis, el metabolismo hepático, o el estrés oxidativo. Estas proteínas se activan en condiciones de estrés trasladándose al núcleo de las células donde llevan a cabo su función como factores de transcripción. Cuando estos factores de transcripción se activan, se ponen en marcha los sistemas ubiquitin-proteasoma, la autofagia y en última instancia la apoptosis, para resolver el estrés de la célula. Pero si esta respuesta frente al estrés se extiende en el tiempo puede desencadenar la activación patológica de estos sistemas de degradación de proteínas que pueden terminar en la muerte celular. Dado

que los resultados recogidos hasta el momento demuestran que el silenciamiento de los genes *TARDBP*, *SOD1* y *FUS* genera un estrés metabólico y oxidativo, se especula que los factores FoxO podrían estar activados bajo estas circunstancias. Debido a que FoxO1 y 3 son los más predominantes en el músculo esquelético, se han analizado estos factores en los modelos celulares de mioblasto en estudio. En la **figura 4.13** se puede apreciar un aumento en la localización de FoxO1 en el núcleo en las líneas shTDP43 y shFUS con respecto a la línea control shRNA. En la línea shSOD1, la localización de FoxO1 se mantiene en el citoplasma similar a lo observado en línea control shRNA, indicando que el estrés oxidativo existente en dicha línea no es suficiente para producir la translocación de este factor al núcleo.

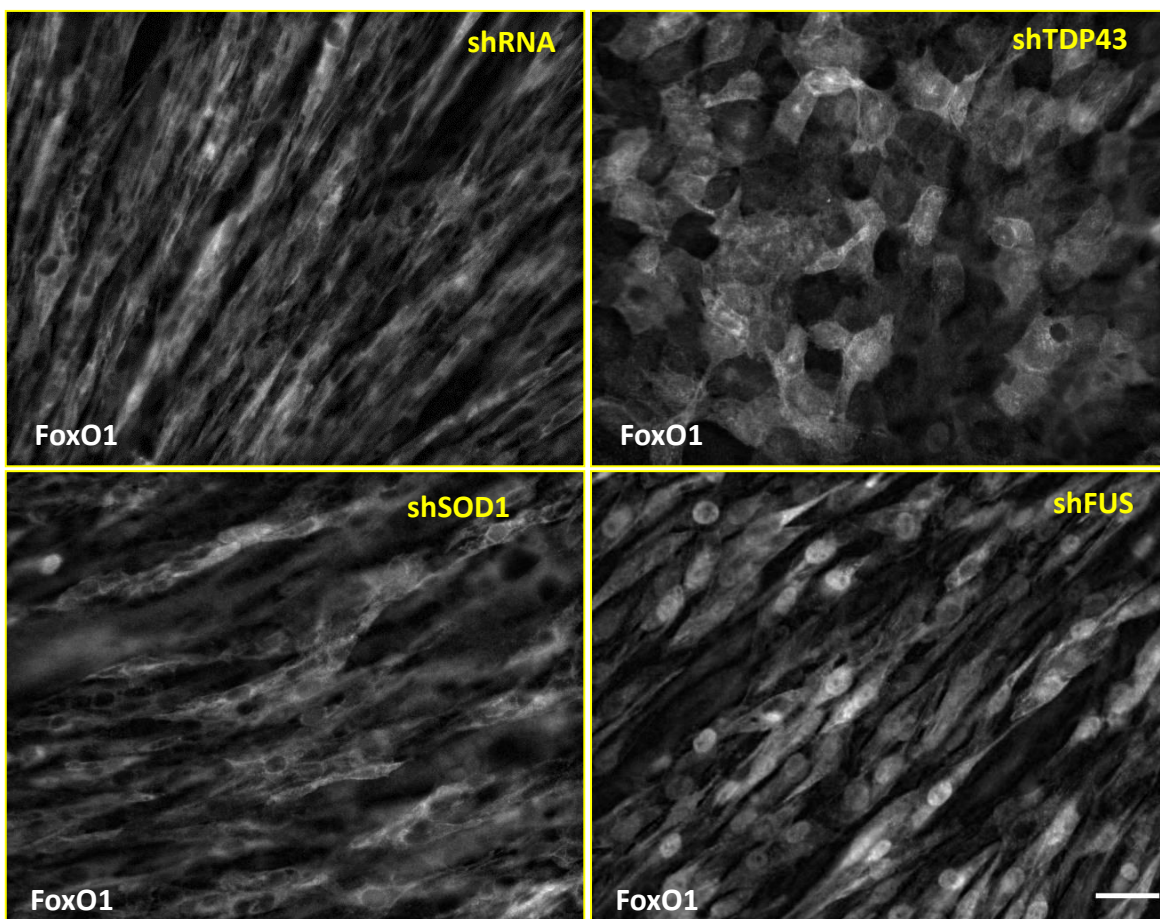


Figura 4.13. Localización de FoxO1 en las líneas shRNA, shTDP43, shSOD1 y shFUS. Inmunofluorescencia de FoxO1 (blanco). Escala 38 μ m.

Debido a que la pérdida de función de TDP-43 está asociada a cambios extensos en la expresión génica y los eventos de *splicing* (Kapeli et al., 2016), realizamos un análisis de *microarrays* para definir los perfiles globales de expresión génica del silenciamiento de *TARDBP* en mioblastos 8220, tras los cuales encontramos indicios de regulación génica que apoyan la reprogramación metabólica observada. El análisis de las células infectadas con shTDP43, en comparación con las células infectadas con shRNA control, revela que hay 1.329 genes regulados al alza (\log_2 fold change ≥ 1 , false discovery rate [FDR] ≤ 0.05), mientras que 673 genes se encuentran regulados a la baja (\log_2 fold change ≤ -1 , false discovery rate [FDR] ≤ 0.05) (**figura 4.14, A**). Usando oPOSSUM-3 (<http://opossum.cisreg.ca/oPOSSUM3/>), una herramienta para la identificación de sitios de unión de factores de transcripción sobre-representados (TFBS) en genes co-expresados, se ha generado un lista de factores de transcripción (ordenados por Z-score) que mejor predicen la expresión génica diferencial de los mioblastos shTDP43 (**figura 4.14, B**). Uno de los principales candidatos que predice la expresión génica diferencia de los mioblastos silenciados en TDP-43 es FoxO3. Al realizarse un análisis TFBS alternativo mediante el uso del software DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>), se observa que, además de FoxO3, FoxO1 también está en la lista de los diez principales factores que regulan la expresión génica diferencial del silenciamiento de *TARDBP* (datos no mostrados).

Los factores FoxO son mediadores conservados evolutivamente de la señalización de la insulina y del factor de crecimiento IGF-1 que rigen los programas de expresión génica para regular la apoptosis, el ciclo celular, la diferenciación celular, el metabolismo y la autofagia (Link and Fernandez-Marcos, 2017). En particular, FoxO1 se une y regula la expresión de múltiples genes que controlan el mantenimiento y la diferenciación de las células progenitoras musculares (Kitamura et al., 2007). Curiosamente, el análisis de ontología génica (GO) en mioblastos tratados con shTDP-43 revela un enriquecimiento significativo de las vías KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes*

and Genomes), Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto, que están aguas arriba o aguas abajo de la transactivación de FoxO, como la señalización de insulina y PI3K-Akt, o el ciclo celular (**figura 4.14, C**). En conjunto, la desregulación de los factores de FoxO puede proporcionar una explicación convincente para las alteraciones miogénicas asociadas a los trastornos en el metabolismo de la glucosa en los mioblastos con silenciamiento de TDP-43 y, por lo tanto, convertirse en posibles dianas candidatas para aliviar estos defectos (**figura 4.14**).

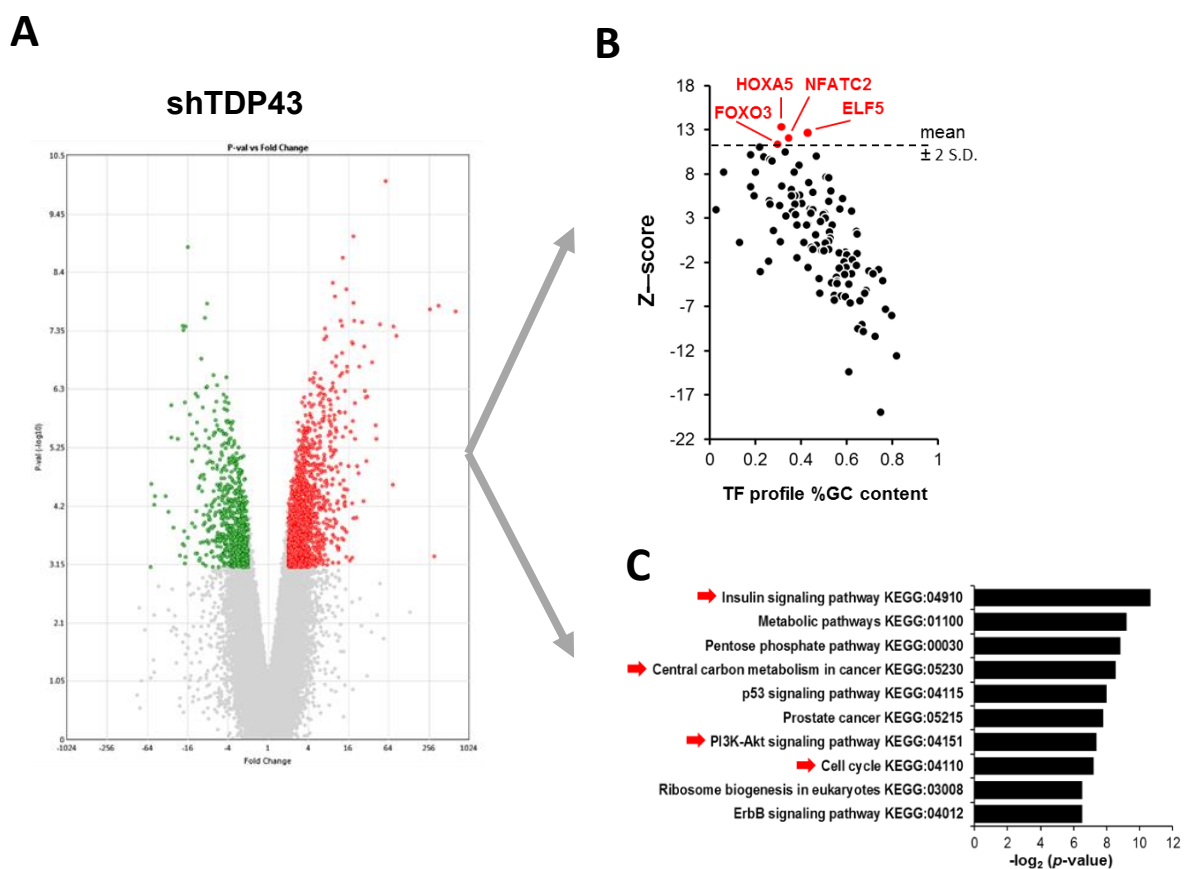
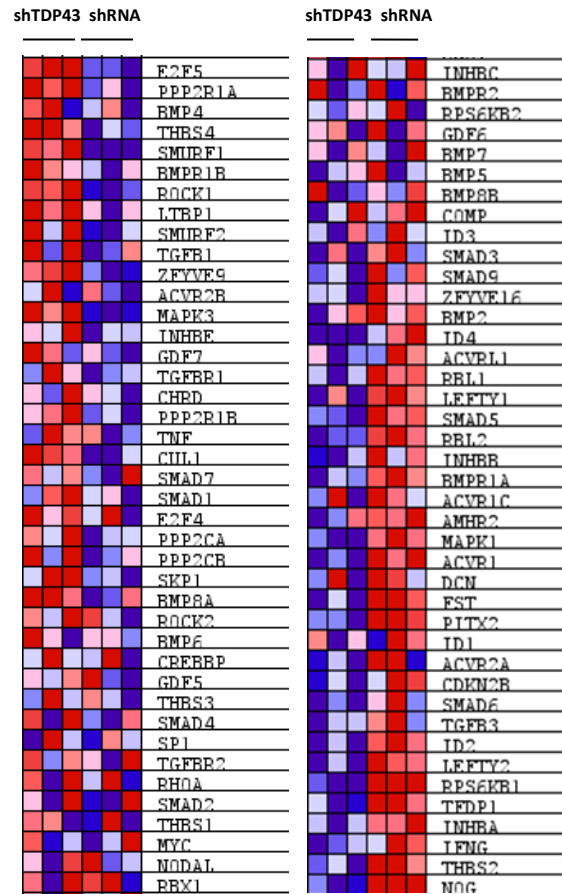


Figura 4.14. Análisis de los factores de transcripción más activos mediante la cuantificación del transcriptoma.

Mediante un análisis de enriquecimiento del conjunto de genes (GSEA, Broad Institute, EEUU) se observa que una de las primeras vías en el ranking de vías sobre-reguladas en los mioblastos deficientes en TDP-43 es la correspondiente a TGF- β (**figura 4.15**). Esta vía también se encuentra significativamente sobre-regulada en el análisis de ontología génica DAVID (dato no mostrado). La

activación de la vía de señalización de TGF- β contribuye de forma importante a la translocación de FoxO al núcleo.



1	GO_SPLICEOSOMAL_COMPLEX_ASSEMBLY		
2	PID_TGFBR_PATHWAY		
3	GO_U12_TYPE_SPLICEOSOMAL_COMPLEX		
4	GO_TELOMERIC_DNA_BINDING		
5	GO_RIBONUCLEOPROTEIN_COMPLEX_SUBUNIT_ORGANIZATION		
6	GO_PROTEIN_PHOSPHATASE_1_BINDING		
7	GO_TELOMERASE_HOLOENZYME_COMPLEX		
8	GO_NEGATIVE_REGULATION_OF_TELOMERE_MAINTENANCE		
9	GO_CAJAL_BODY		
10	BYSTRYKH_HEMATOPOIESIS_STEM_CELL_AND_BRAIN_QTL_CIS		
11	MOREAUX_MULTIPLE_MYELOMA_BY_TAC1_DN		
12	GO_POSITIVE_REGULATION_OF_SMOOTHENED_SIGNALING_PATHWAY		
13	KEGG_UBIQUITIN_MEDIATED_PROTEOLYSIS		

Figura 4.15. Análisis de las vías sobreexpresadas en los mioblastos silenciados en *TARDBP* mediante la tecnología del microarray GSEA. De las 5000 vías estudiadas en la posición 2 de sobreexpresión se encuentra la vía TGF- β con un valor de $p=0$, ($n=3$).

4.4. Translocación nuclear de los factores de transcripción FoxO al núcleo en mioblastos primarios derivados de pacientes con ELA

Para poder observar si este fenómeno de localización de FoxO nuclear se produce en los mioblastos de pacientes, de las formas tanto esporádica como familiar, se han realizado biopsias de músculo para su posterior tratamiento de extracción de mioblastos tanto de pacientes vivos como *post-mortem*, en los cuales los fragmentos de músculo han sido inmediatamente extraídos tras la muerte del paciente para preservar la viabilidad del tejido.

La **figura 4.16** muestra que los mioblastos primarios derivados de un paciente con ELA esporádica presentan una localización de FoxO1 mayoritariamente nuclear con respecto a los mioblastos control. Asimismo, los mioblastos primarios derivados de un paciente con ELA familiar presentan una menor localización nuclear que el anterior, aunque significativamente mayor, con respecto a mioblastos derivados del individuo control.

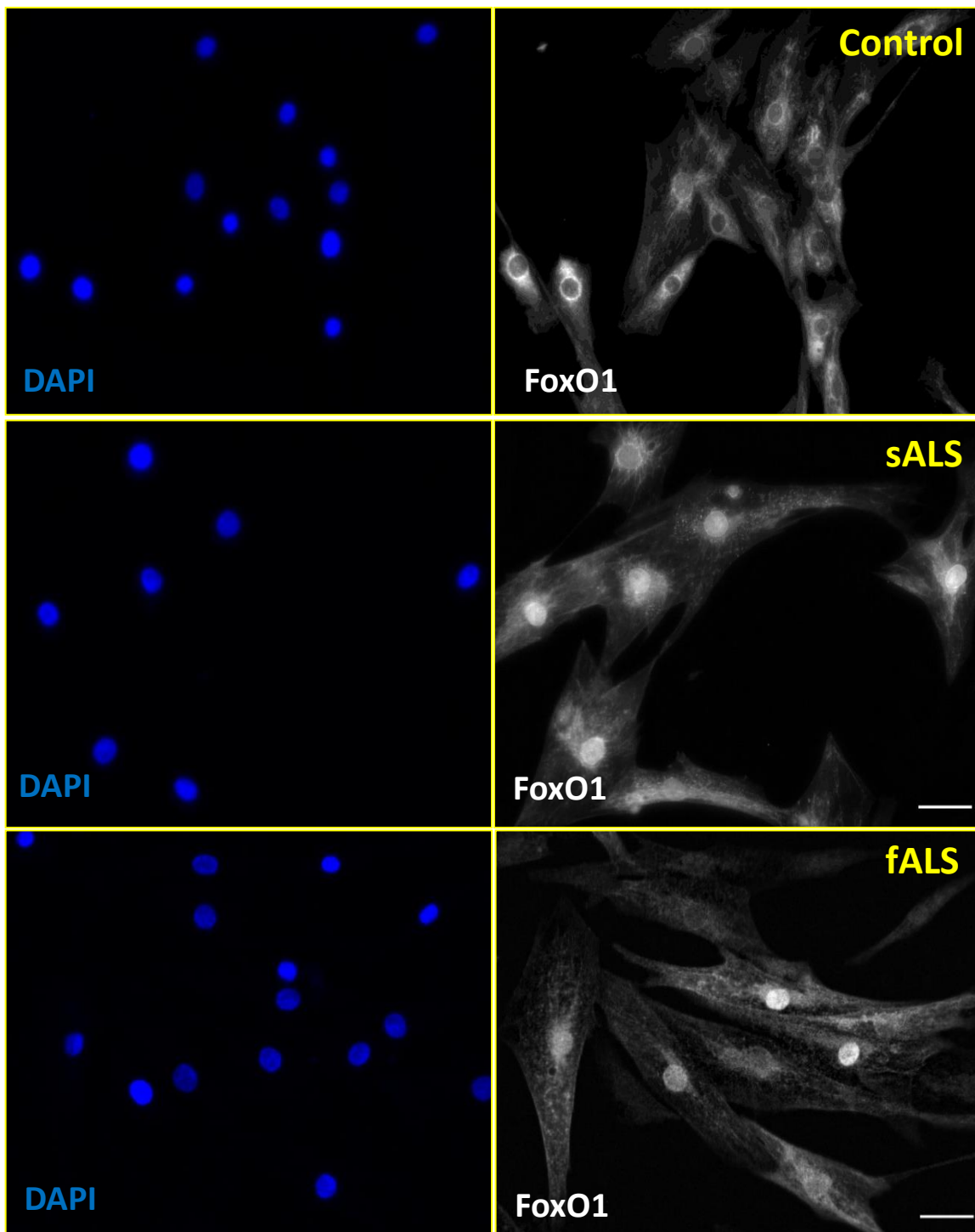


Figura 4.16. Localización nuclear de FoxO1 en pacientes con ELA esporádica y familiar con respecto al control sano. Inmunofluorescencia de FoxO1 (blanco). Escala 38 μ m.

Para demostrar que la translocación de FoxO1 al núcleo, en mioblastos derivados de pacientes, podría estar relacionada con la posible pérdida de función de TDP-43, tal y como se ha observado en las líneas silenciadas para *TARDBP* en las que FoxO1 se localiza en el núcleo, se han realizado varios estudios de inmunofluorescencia dobles tanto para TDP-43 como para FoxO1. En dichas inmunofluorescencias se observa una localización antagónica de las dos proteínas. La localización de FoxO1 nuclear se acompaña de la deslocalización de TDP-43 del núcleo. Los núcleos en los que los niveles de TDP-43 están disminuidos, los niveles nucleares de FoxO1 se encuentran elevados. Para poder observar más nítidamente la relación de localización entre TDP-43 y FoxO1, se representa el paciente con ELA familiar debido a la mayor heterogeneidad de localización de FoxO1 nuclear en comparación con la forma esporádica (**figura 4.17**). En la **figura 4.17** se ven los núcleos con niveles de TDP-43 disminuidos (flecha roja), que corresponden a los núcleos con niveles de FoxO1 elevados (flecha amarilla).

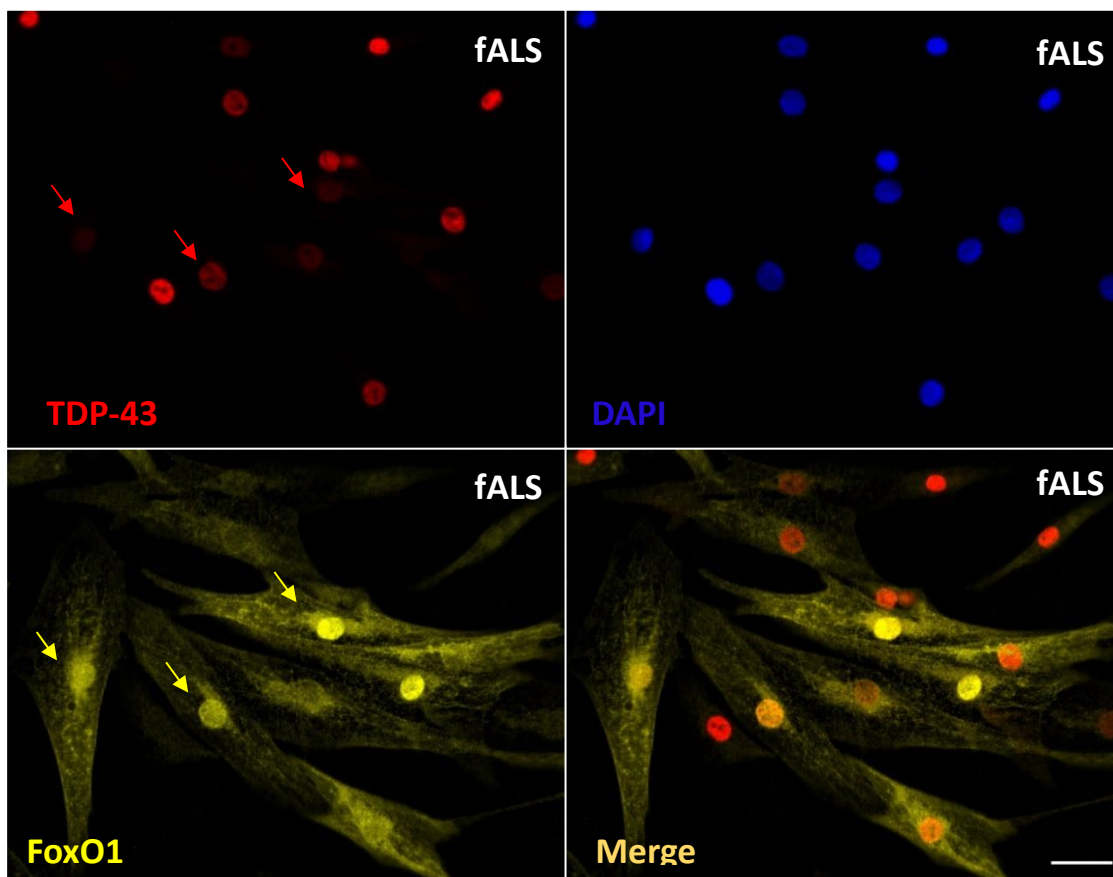


Figura 4.17. Colocalización de TDP43 y FoxO1 en mioblastos de paciente con ELA familiar. Inmunofluorescencia de TDP-43 (rojo), FoxO1 (amarillo) y DAPI (azul). Escala 38 μ m.

La inmunofluorescencia para TDP-43 muestra que los niveles nucleares de TDP-43 están significativamente disminuidos en mioblastos primarios derivados del paciente 2 (forma familiar), en comparación con mioblastos derivados de un individuo control. Sin embargo, los mioblastos derivados del paciente 1 (forma esporádica) presentan niveles significativamente mayores de TDP-43 nuclear, en comparación con el control. Se analizaron un total de 40 células por grupo mediante el programa ImageJ (**figura 4.18**).

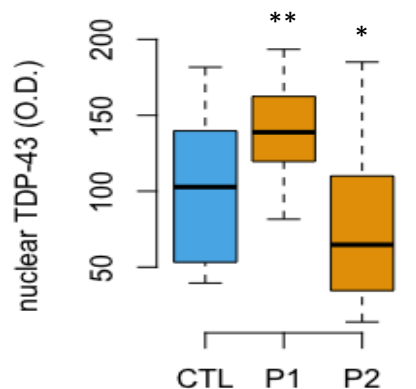


Figura 4.18. Cuantificación de TDP-43 nuclear. Se analizaron un total de 40 células por grupo mediante ImageJ. P1 (sALS); P2 (fALS). Prueba t-Student, *p<0,05 **p<0,01 *p<0,001.**

Por otra parte, el análisis de expresión de proteínas mediante Western blot en los núcleos separados previamente por fraccionamiento celular, confirmaron los resultados anteriores, los cuales indican un aumento de TDP-43 nuclear en el paciente con ELA esporádica y una disminución en el paciente con ELA familiar (**figura 4.19**). Sorprendentemente, la localización de TDP-43 en los núcleos del paciente con ELA esporádica se encuentra en la zona perinuclear formando un halo que no aparece en los núcleos del control sano (**figura 4.19**). Cabe destacar la divergencia entre el aumento de expresión nuclear de TDP-43, medida por fraccionamiento celular e inmunofluorescencia, y la localización perinuclear observada en la **figura 4.19**, se puede concluir que al realizar los fraccionamientos celulares, la fracción nuclear podría contener este componente perinuclear.

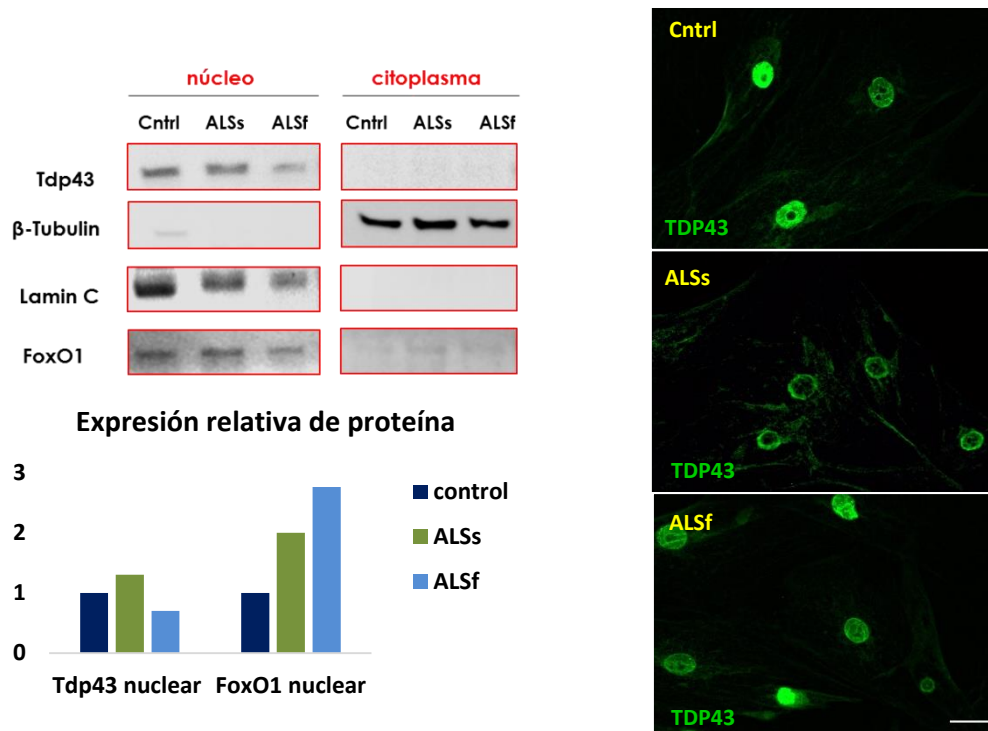


Figura 4.19. Cuantificación de la expresión nuclear de TDP-43 mediante Western blot y análisis de localización de TDP43 por inmunofluorescencia en mioblastos primarios. TDP-43 (verde). Escala 19 μ m.

Respecto a la expresión de FoxO1, la cuantificación por Western blot, tras una separación de los compartimentos por fraccionamiento celular, indica un aumento de FoxO1 en el núcleo tanto en el paciente con ELA esporádica como en el paciente con la forma familiar con respecto al control sano (**figura 4.19**). La Inmunofluorescencia para FoxO1 (**figura 4.16**) muestra que los niveles nucleares absolutos de Foxo1 están ligeramente aumentados en mioblastos derivados del paciente 1 (ELA esporádica) como del paciente 2 (ELA familiar), aunque sin llegar a valores significativos, en comparación con mioblastos derivados del individuo control. Sin embargo, la localización nuclear de FoxO1, indicada como el cociente entre los niveles nucleares y citosólicos, que representaría la tasa de distribución de FoxO1 en la célula, se encuentra significativamente aumentada tanto en mioblastos del paciente 1 (ELA esporádica) como del paciente 2 (ELA familiar) (**figura 4.20**).

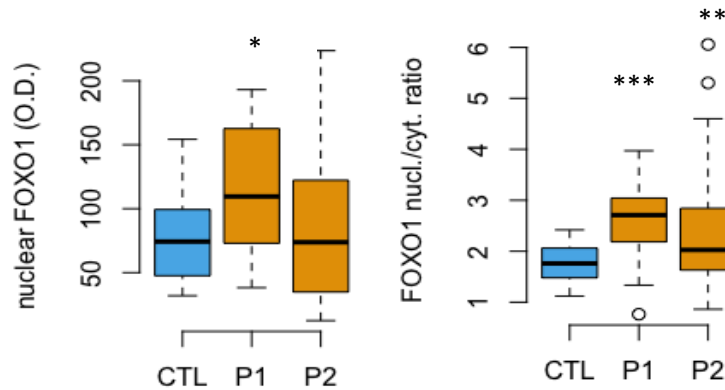


Figura 4.20. Cuantificación de FoxO1 nuclear y la tasa de localización nuclear respecto la localización citosólica. n=40 cels/grupo. P1 (sALS); P2 (fALS). Prueba t-Student, *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001.

Si se representan los valores nucleares de FoxO1 y la tasa de distribución nuclear de FoxO1 respecto a la localización citosólica en función de los niveles nucleares de TDP-43, se observa que tanto los niveles nucleares de FoxO1 como la relación núcleo-citoplasmática de FoxO1 están específicamente y significativamente aumentados en aquellas células con valores reducidos (por debajo de la mediana) de TDP-43 nuclear. Esto se observa en las células del paciente 2, pero no así en las del paciente 1 (figura 4.21).

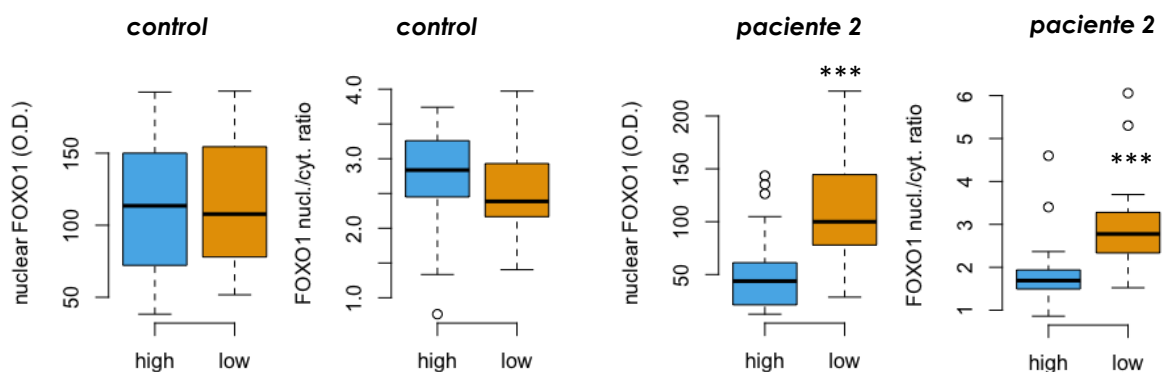


Figura 4.21. Cuantificación de FoxO1 nuclear y la tasa de localización nuclear respecto la localización citosólica en función de los niveles de TDP-43 nuclear. Se analizaron un total de 40 células por grupo mediante ImageJ. P1 (sALS); P2 (fALS). Prueba t-Student, *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001.

Un resultado sorprendente ha sido la observación de unos acúmulos citoplasmáticos positivos para TDP-43 en aquellas células del paciente con la forma esporádica que presentan una halo perinuclear de TDP-43 (**figura 4.22**). Para comparar estos acúmulos con los agregados citoplasmáticos de TDP-43 de las motoneuronas en la ELA, se ha realizado una doble inmunofluorescencia para TDP-43 y la proteína *scaffold* 14-3-3, que es un componente habitual de dichos agregados. Además, la proteína 14-3-3 participa en un mecanismo de translocación nuclear de FoxO1 que es potencialmente dependiente de TDP-43. En este sentido, cuando TDP-43 migra al citosol en situaciones de estrés para regular la expresión de RNA en los gránulos de estrés, secuestra a la proteína 14-3-3 liberando a FoxO1 de su interacción con 14-3-3, y promueve su translocación al núcleo (Zhang *et al.*, 2014). En la doble inmunofluorescencia se puede advertir la co-localización de TDP-43 y 14-3-3 en esos agregados circulares que aparecen incluso cerca de la membrana plasmática (puntas de flecha blancas), pudiendo sugerir la naturaleza vesicular y exocítica de dichos acúmulos (**figura 4.23**).

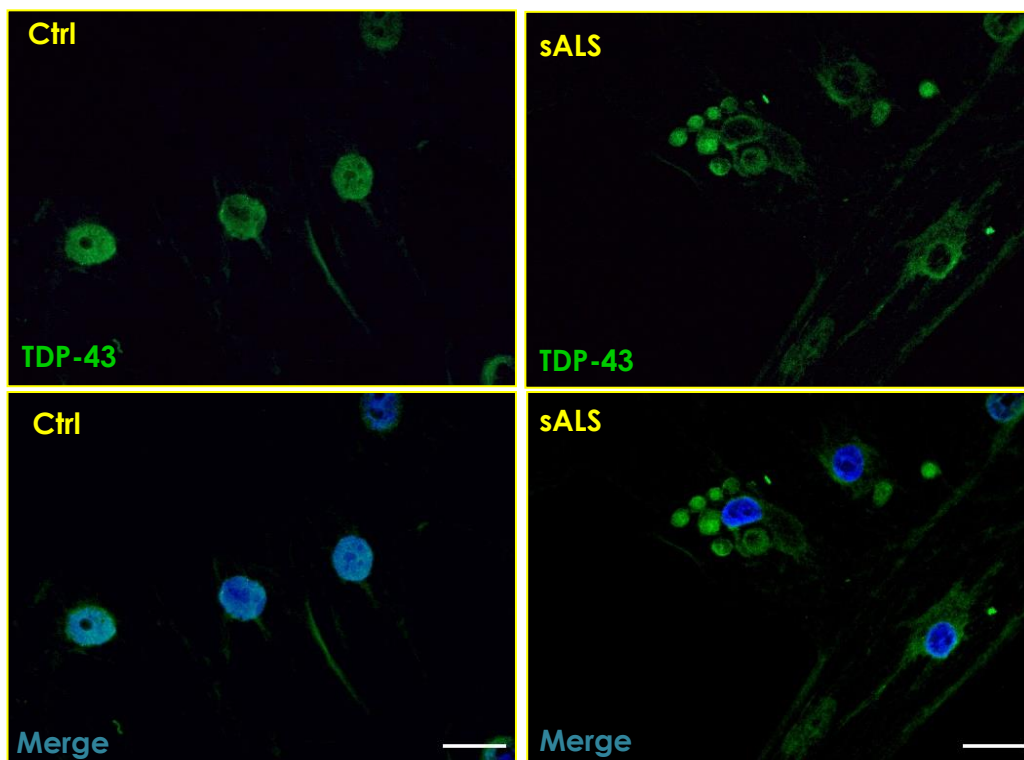


Figura 4.22. Inmunofluorescencia de TDP-43 (verde) en mioblastos primarios de control sano y paciente con ELA esporádica. Se pueden ver agregados vesiculares rodeando al halo perinuclear en el paciente. Escala 19 μ m.

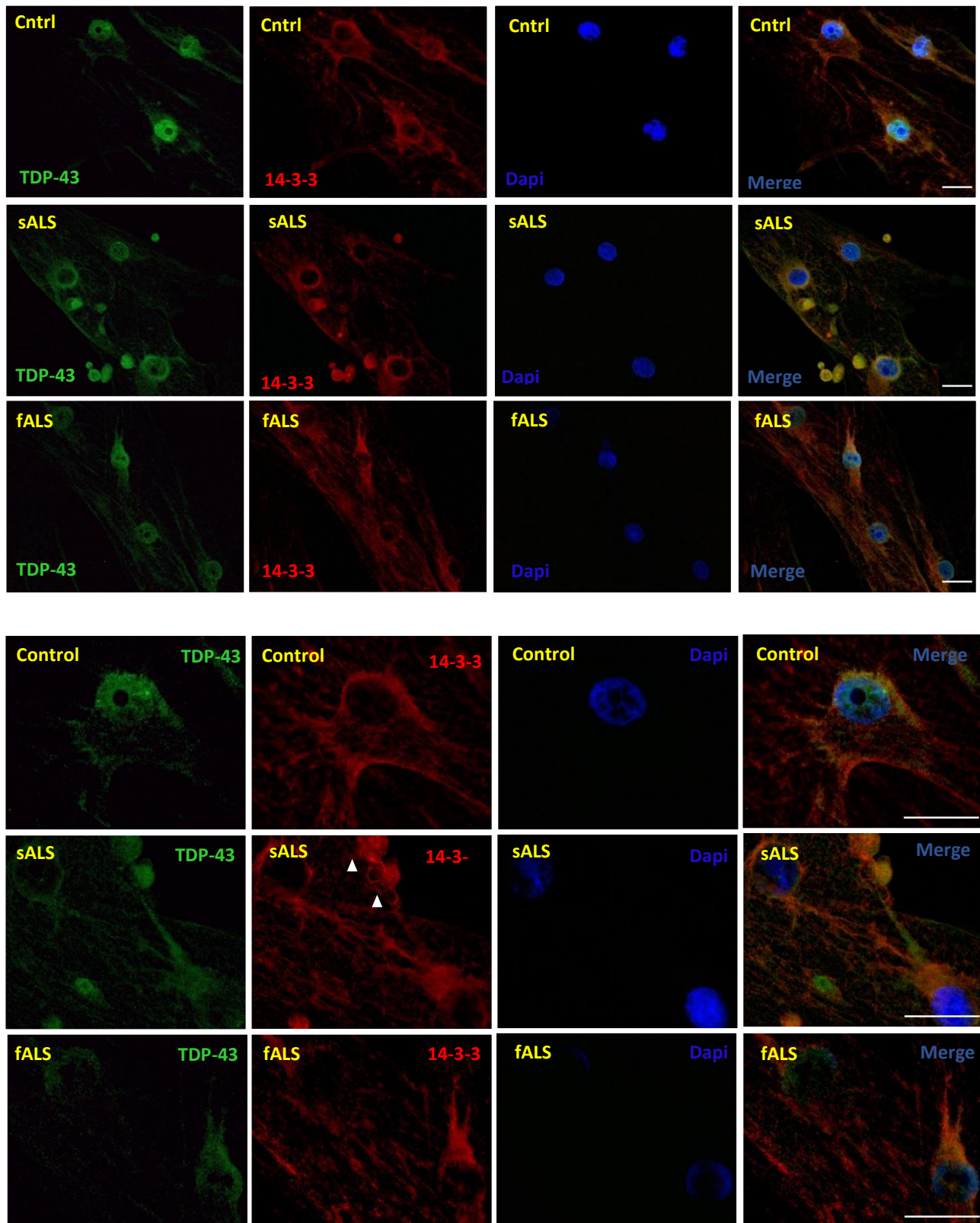


Figura 4.23. Colocalización de TDP-43 (verde) y 14-3-3 (rojo) en los acúmulos citoplasmáticos (puntas de flechas blancas). Escala 19 μ m.

Según los resultados hasta el momento, en los mioblastos humanos silenciados con TDP-43, FUS y SOD1 tienen defectos metabólicos glucolíticos sobre todo en shTDP43 y shFUS que podrían ser los causantes de la translocación de FoxO1 al núcleo. Esta traslocación de FoxO1 originaría los defectos en la diferenciación celular impidiendo la formación de miotubos en estas líneas silenciadas. En los mioblastos de pacientes de la forma familiar y esporádica, se perciben también defectos en la glucólisis, con lo que se relaciona los defectos de diferenciación con dicha alteración metabólica que conduce a la activación nuclear de FoxO1. Sin embargo, hasta el momento, no se ha demostrado en este trabajo que la alteración metabólica origine la translocación nuclear de FoxO1 o que por el contrario, sea la traslocación de FoxO1, en realidad, la responsable de la alteración metabólica y la deficiencia en la diferenciación celular, o incluso sean las dos condiciones simultáneamente. Para estudiar la direccionalidad de los acontecimientos, se define como diana de tratamiento la inhibición de los factores FoxO y/o el silenciamiento génico de los genes que codifican dichos factores de transcripción.

5. TRATAMIENTO DE LA DISFUNCIÓN METÁBOLICA Y MIOGÉNICA GENERADA POR LA PÉRDIDA DE FUNCIÓN DE TDP-43, FUS Y SOD1 EN MIOBLASTOS SILENCIADOS Y EN MIOBLASTOS DE PACIENTES

5.1. La inhibición de FoxO en el núcleo restaura el fenotipo metabólico en las líneas silenciadas y en los mioblastos de pacientes con ELA

El inhibidor de los factores FoxO, patentado previamente, es el compuesto AS1842856 de Astellas Pharma, una oxodihidroquinolina permeable en la célula, cuyo mecanismo de acción consiste en bloquear la unión de dichos factores al DNA para impedir la actividad transcripcional de dichos factores, y así impedir su función reguladora de las diferentes funciones celulares como la proliferación y diferenciación celular. Este inhibidor tiene diferentes afinidades para los diferentes tipos de factores FoxO. Así pues, a una concentración de 100nM la actividad sobre los factores FoxO es 70%, 20%, y 3% de inhibición, para FoxO1, FoxO3 y FoxO4 respectivamente. La concentración del inhibidor utilizada en estos ensayos ha sido 33nM que corresponde a la del índice 50, es decir, la concentración a la que se inhibe el 50% de FoxO1 su diana principal (IC₅₀). Este tratamiento se ha dejado durante 24h en todos los ensayos de medición del metabolismo: Seahorse, análisis metabolómico mediante ¹H-RMN, análisis metabolómico mediante UPLC-SM y análisis de expresión de proteínas mediante Western blot.

5.1.1. Efecto de la inhibición de FoxO en la glucolisis

En la **figura 5.1** se representa los resultados del ensayo con la técnica del Seahorse para medir el parametro ECAR que representa la disminución del ph del medio extracelular y que es proporcional a la actividad glucolítica. Estas variaciones de ph se producen tras añadir en diferentes momentos glucosa, oligomicina y 2-deoxiglucosa (2-dg) que finalmente bloquea la vía glucolítica y finaliza en ensayo. Las variaciones en el ECAR se representan en la **figura 5.1** que muestra la glucolisis, la capacidad glucolítica y la reserva

glucolítica. Como recordatorio, la glucolisis aumenta al añadir glucosa al medio y la disminucion del ph será proporcional a la glucolisis.

La capacidad glucolítica es la disminucion del ph cuando se inhibe la mitocondria en el complejo V de la respiración miotcondrial. De la capacidad glucolítica restando la glucolisis se obtiene la reserva glucolítica. El efecto del inhibidor en el metabolismo glucídico es significativo en las líneas shTDP43 y shFUS, aumentando los valores de los tres parámetros, glucolisis, capacidad glucolítica y reserva glucolítica, mientras que en la línea shSOD1 el efecto sobre la activación del metabolismo glucídico recae en la capacidad y reserva glucolíticas. En el control, shRNA, no hay cambios metabólicos. El inhibidor AS1842856 aumenta considerablemente el metabolismo de la glucosa.

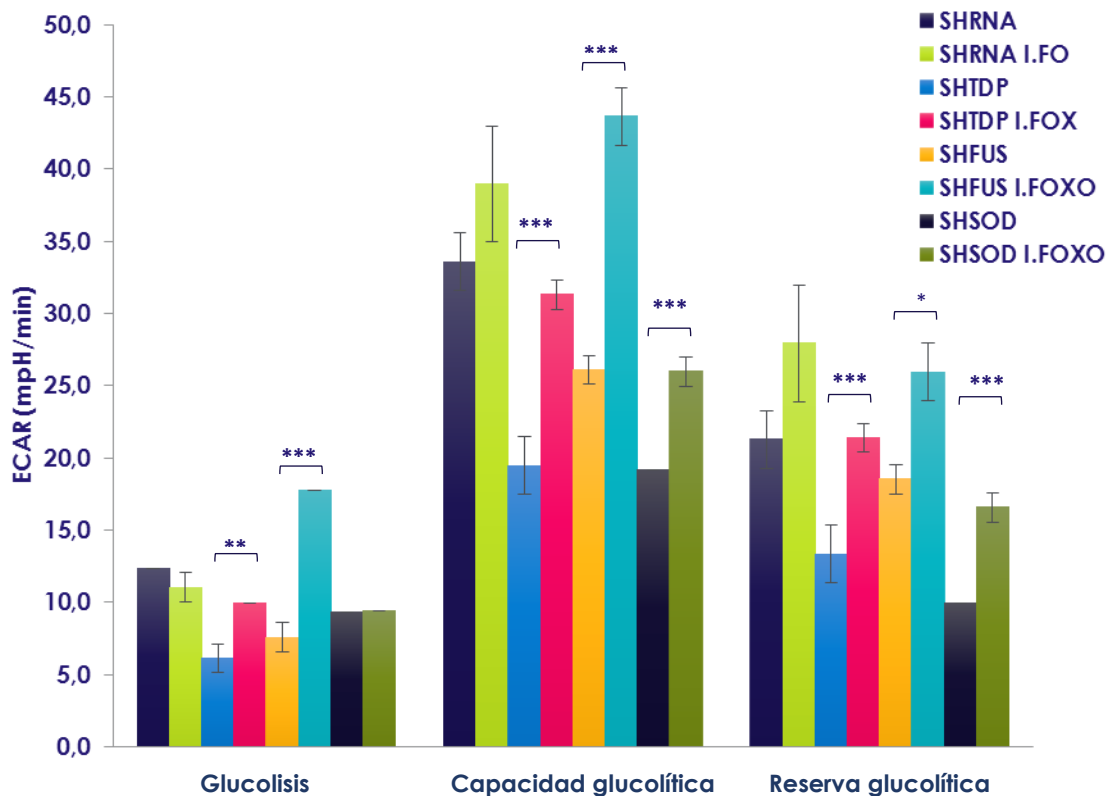


Figura 5.1. Aumento de la glucolisis en las líneas silenciadas por efecto del inhibidor de FoxO, AS1842856. Prueba t-student *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001, (n=6).

Asimismo, el efecto del inhibidor en la respiración mitocondrial es significativo con respecto a las líneas no tratadas. En la **figura 5.2** se puede observar un aumento en la síntesis del ATP mitocondrial medido por la técnica del Seahorse y basándose en el O₂ consumido. Si bien es cierto que estos valores de ATP mitocondrial podrían estar influenciados por el aumento de piruvato proveniente del aumento de la glucólisis porque el combustible utilizado para ambas medidas ha sido la glucosa.

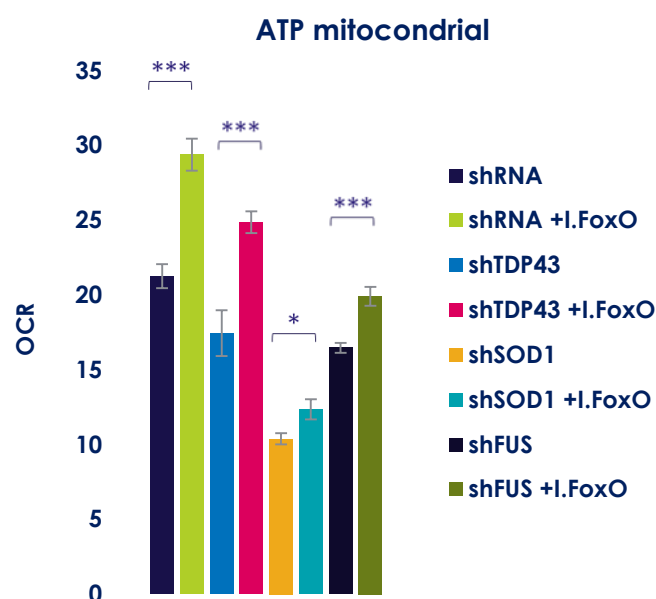


Figura 5.2. Aumento del ATP mitocondrial en las líneas silenciadas por efecto del inhibidor de FoxO, AS1842856. Prueba t- Student, (n=6). *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001.

En cuanto a los mioblastos de pacientes representativos de las formas esporádica y familiar, la glucólisis que se encuentra disminuida en ambos pacientes con respecto al control, con el tratamiento inhibidor de foxO1 en las mismas condiciones que los mioblastos silenciados, esto es, 24 horas de tratamiento con la molécula AS1842856 a 33 nM, aumenta de manera significativa en el paciente de la forma esporádica. Este aumento en la glucólisis llega hasta los valores de los mioblastos control (**figura 5.3**). En el paciente de la forma familiar, aunque la disminución de la actividad glucolítica es menor que en el control, la diferencia no es estadísticamente

significativa, aunque si bien es claro que hay una tendencia a aumentar la glucolisis.

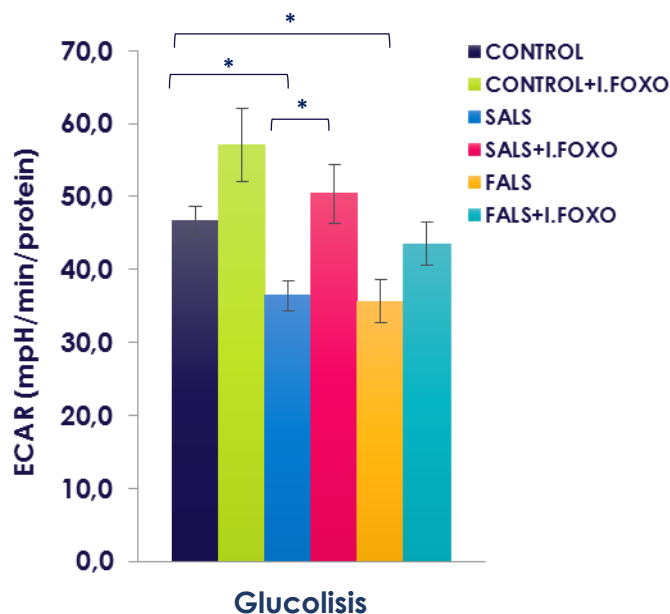
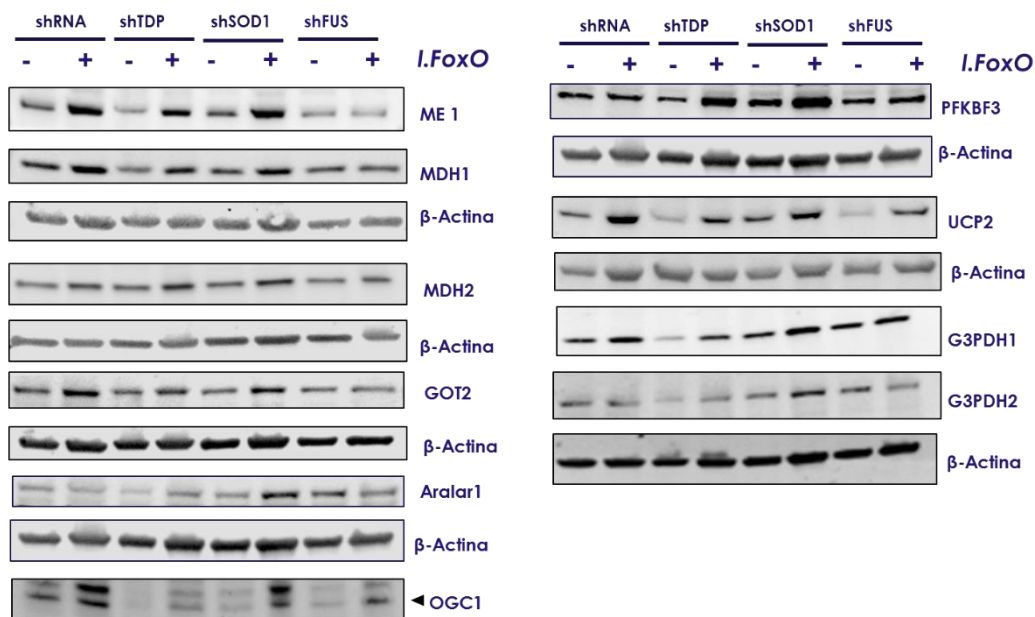


Figura 5.3. Medida del parámetro ECAR proporcional a la actividad glucolítica en mioblastos primarios control y paciente tanto de la forma esporádica como familiar. Prueba t-Student, *p<0,05. **p<0,01. ***p<0,001, (6 réplicas).

5.1.2. Efecto del tratamiento inhibitorio de FoxO en las enzimas metabólicas y en los metabolitos de las reacciones que catalizan

Este aumento de la capacidad glucolítica viene dado por un aumento de las enzimas que participan en la regulación de la glucolisis, la PFKFB3 (PFK2), las enzimas de la lanzadera del glicerol, las enzimas de la lanzadera de malato-aspartato y de la proteína transportadora mitocondrial, la UCP2, que bombea esqueletos carbonado al citosol para la regeneración del NAD⁺ y que con ello, activa la glucolisis. Los resultados obtenidos por el análisis de proteínas mediante WB indican en la **figura 5.4** que el tratamiento con el inhibidor de FoxO AS1842856 durante 48 horas, actúa en diversas enzimas glucolíticas: aumenta la expresión de las enzimas OGC1, UCP2, G3PDH1 de forma significativa en el control shRNA; aumenta la expresión de las enzimas Aralar1/AGC1, OGC1, UCP2, MDH1, PFKBF3, G3PDH1 y G3PDH2 en la línea

con el silenciamiento de *TARDBP*; aumenta de forma significativa la enzima UCP2 en la línea shFUS y en el silenciamiento de SOD1 el tratamiento con el inhibidor aumenta la expresión de las enzimas Aralar1/AGC1, OGC1, UCP2 y G3PDH1 de forma significativa. Aunque el inhibidor actúe en todas las líneas, hay que tener en cuenta que las enzimas analizadas no se encuentran alteradas de forma constitutiva en todas las líneas por igual y que, posiblemente, aumentando el número de experimentos realizados, el efecto del inhibidor en la expresión de enzimas podría más homogéneo.



Expresión de proteína relativa al no tratado

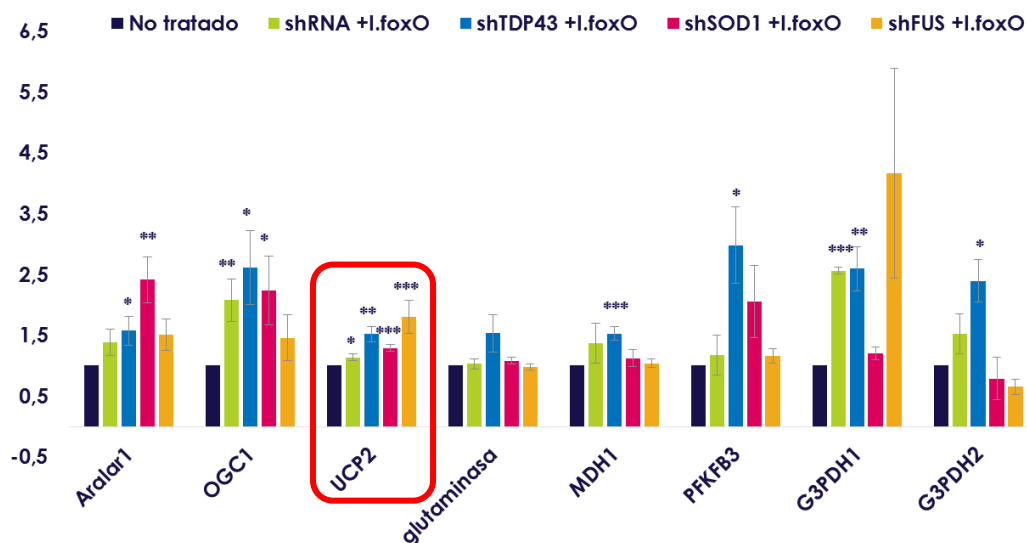


Figura 5.4. Aumento de las enzimas metabólicas de las lanzaderas de glicerol y malato-aspartato en las diferentes líneas silenciadas analizadas mediante Western blot. Prueba t-Student, *p<0,05. **p<0,01. ***p<0,001, (n=3).

La cuantificación de los metabolitos glutamina, glutamato y aspartato reflejan la actividad de las enzimas de la lanzadera de malato aspartato y de la glutaminólisis. Esta medida se ha realizado con la tecnología basada en la ^1H -RMN de alta resolución y se han calculado los *ratios* Glu/Gln y Glu/Asp. Teniendo en cuenta que el *ratio* Glu/Asp refleja la actividad de las enzimas de la lanzadera, el *ratio* Glu/Gln es necesario conocer para ver la disponibilidad de glutamato a partir de glutamina, reacción que cataliza la glutaminasa y que no cambia con la inhibición de FoxO como indica la **figura 5.4**. Los niveles de aspartato elevados en la línea shTDP43 (dato no mostrado), disminuyen con el tratamiento del inhibidor de FoxO. Al calcular el *ratio* Glu/Asp tras el tratamiento, aumenta debido a la disminución de aspartato (**figura 5.5**). Este hecho responde al aumento de la expresión de las enzimas que consumen aspartato, como muestra la **figura 5.4**, para la regeneración de NAD^+ . El *ratio* Glu/Gln no cambia con el inhibidor de FoxO como tampoco cambia la enzima glutaminasa.

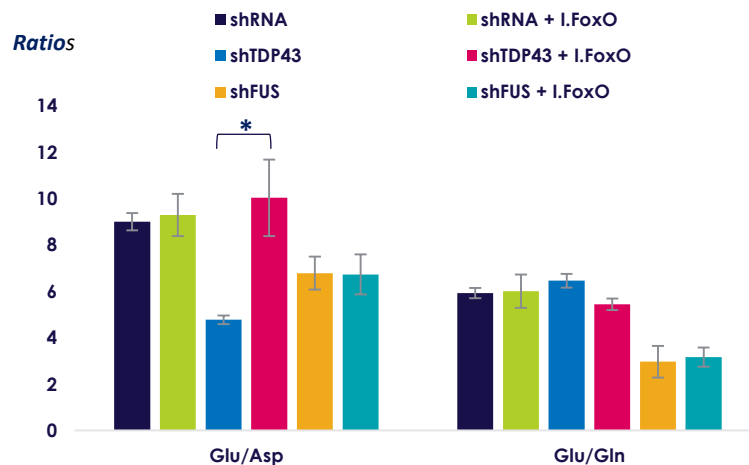


Figura 5.5. Aumento del *ratio* Glu/Asp en la línea shTDP43. Prueba t-Student * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$, (n=3).

5.1.3. Estudio del transportador UCP2; el principal enzima cuya expresión desciende con el silenciamiento de *TARDBP* y que está regulada por FoxO

La enzima que aumenta de forma significativa en todas las líneas, con el tratamiento inhibitorio de FoxO, es el transportador mitocondrial UCP2. Dada su relevancia en la regulación de la glucólisis (Bouillaud, 2009; Ayyasamy *et al.*, 2011; Sreedhar *et al.*, 2017) y que la pérdida de función de TDP-43 conduce a un descenso significativo de la expresión de UCP2, se silenció el gen *UCP2* en los mioblastos humanos inmortalizados *wild type*, para analizar el proceso de diferenciación celular y la relación con la glucólisis, y el efecto del inhibidor de FoxO en dicho silenciamiento. Asimismo, se estudió la inhibición de UCP2 con genipina a 100 μ M durante 24 horas, una molécula cuya función como inbidor de esta enzima es conocida (Mailloux, Adjeitey and Harper, 2010; Ayyasamy *et al.*, 2011; Zhong *et al.*, 2018).

El porcentaje estadísticamente significativo ($p=0,023$) de expresión proteica del silenciamiento de *UCP2*, obtenido en los mioblastos 8220 inmortalizados, fue de un 40% (figura 5.6).

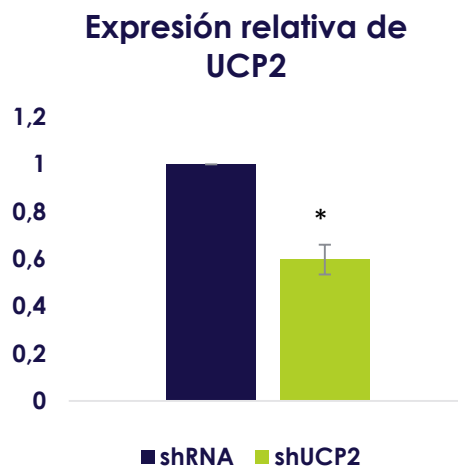


Figura 5.6. Expresión proteica de UCP2 respecto al control de la infección shRNA. Prueba t-Student, * $p<0,05$ ** $p<0,0$. *** $p<0,001$, (n=3).

Los resultados del ensayo de la glucólisis del *Seahorse* indicaron una reducción significativa de esta vía metabólica, tanto en el silenciamiento de *UCP2*, como en la inhibición farmacológica de la misma. No obstante, el

efecto de la genipina, en la disminución tanto de la glucolisis como de la capacidad y reserva glucolíticas, fue mayor que en el silenciamiento. Esto puede deberse a que la potencia inhibitoria farmacológica sobre la UCP2, en este caso, fue mayor que el silenciamiento génico (figura 5.7).

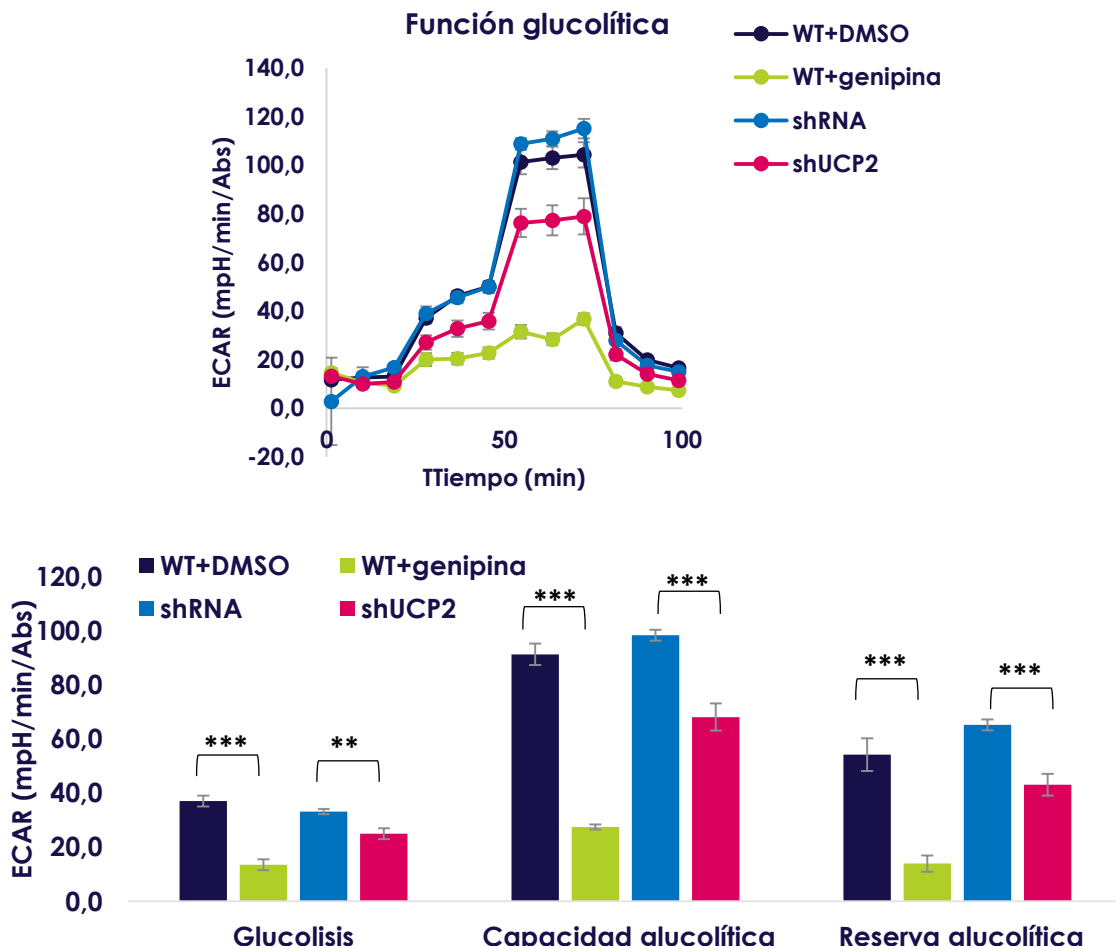


Figura 5.7. Análisis metabólico mediante la técnica Seahorse. WT +DMSO (wild type con el disolvente de la genipina); WT+genipina; shRNA (control de la infección); shUCP2 (silenciamiento de UCP2). Prueba t- Student, *p<0,05 **p<0,0. ***p<0,001, (n=5).

Teniendo en cuenta que una inhibición de la glucolisis disminuye la expresión de MyoD, según los resultados descritos anteriormente en este trabajo, se midió la expresión de MyoD en los mioblastos silenciados para UCP2. Como cabía esperar, se vio que las proteínas UCP2 y MyoD estaban estrechamente ligadas; en tanto en cuanto, al silenciar el gen UCP2, la expresión de MyoD disminuía en función del grado de silenciamiento con un coeficiente de correlación de Pearson de 0,97; relación positiva directa. En términos

generales, un silenciamiento del 60% de *UCP2*, disminuye significativamente un 55% la expresión de MyoD (**figura 5.8**).

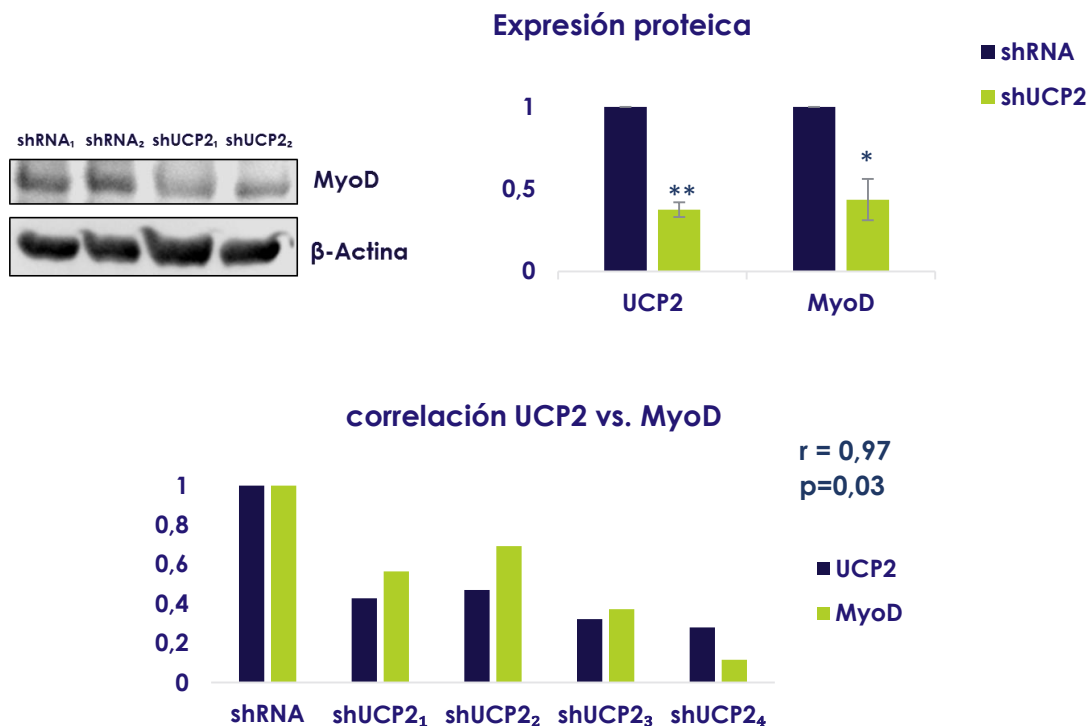


Figura 5.8. Determinación de los niveles proteicos de UCP2 y MyoD mediante Western blot. Relación entre ambas proteínas; $r=0,97$ (Pearson). Prueba t-Student, * $p<0,05$ ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, (n=4).

5.2. La inhibición de FoxO en el núcleo restaura el fenotipo de diferenciación en líneas silenciadas y en los mioblastos de pacientes con ELA

Los mioblastos shTDP43, shFUS y shUCP2, los cuales presentaban niveles más bajos de MyoD con respecto al control shRNA, fueron tratados con el inhibidor de FoxO durante 48 horas, tras el cual se observó un aumento significativo de la expresión de MyoD en todas las líneas (**figura 5.9**). Este aumento podría resolver las deficiencias en la diferenciación celular de estas líneas. Para confirmar esta idea, se inició un tratamiento continuado de dichos mioblastos con el inhibidor de FoxO.

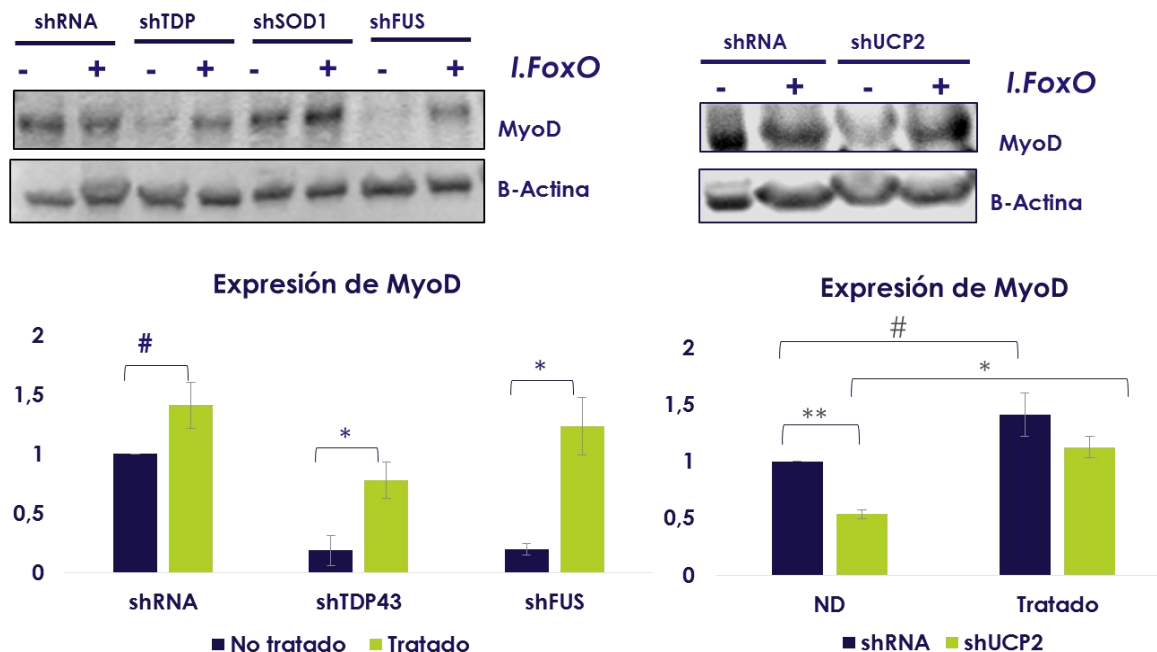


Figura 5.9. Análisis de expresión de MyoD en las líneas silenciadas, que presentan niveles de MyoD más elevados, tras el tratamiento con el inhibidor de FoxO, AS1842856. Prueba t-Student, * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ # $p < 0,01$ (n=3).

Tras 8 días de tratamiento continuado con la molécula AS1842856, en los mioblastos silenciados con los genes *TARDBP*, *SOD1* y *FUS*, se observó una recuperación de la capacidad de diferenciación celular. Esta capacidad se cuantifica con el cálculo del índice de fusión de mioblastos que consiste en el cociente del nº de núcleos que forman parte de los miotubos dividido entre el nº de núcleos totales. En la línea shTDP43, la pérdida de función de TDP-43 provoca la pérdida total de esta capacidad y se recupera con el tratamiento con el inhibidor de FoxO hasta llegar a un índice de fusión de 27,7% que es prácticamente el índice de fusión del control shRNA sin tratamiento (26,7%). En el control shRNA, el tratamiento con el inhibidor de FoxO, el índice de fusión aumenta hasta un 37,8%. En la línea shFUS esta capacidad de diferenciación de mioblasto a miotubo pasa de un índice de fusión del 17,24% a duplicarlo casi hasta el 30,34%. En la línea shSOD1, la fusión de mioblastos se produce de forma aberrante con unos miotubos en forma

de sincitio y el índice de fusión no varía significativamente, tras el tratamiento con el inhibidor de FoxO (**figura 5.11 y figura 5.11**).

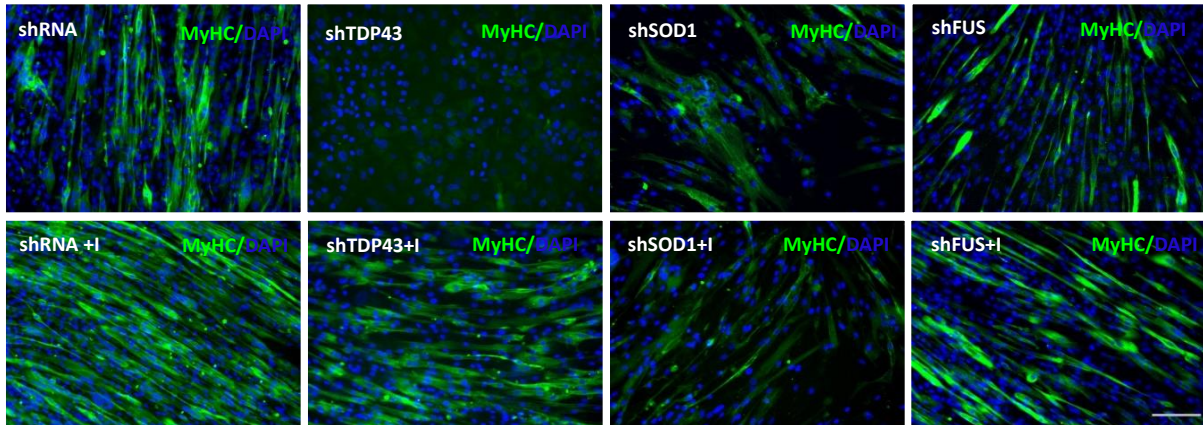


Figura 5.10. Inmunofluorescencia de MyHC (verde) específica de los miotubos y tinción de núcleo con Dapi (azul), con el tratamiento inhibitorio de FoxO. Escala 58 μ m.

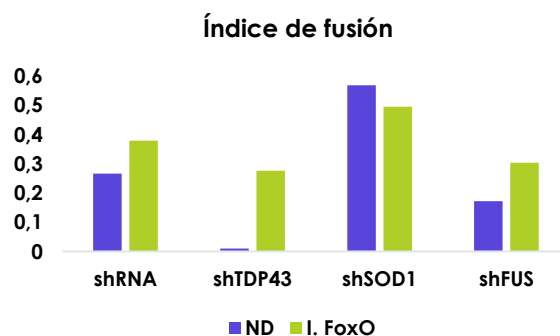


Figura 5.11. Índice de fusión en las líneas silenciadas tras la inhibición de FoxO, cuantificado mediante ImageJ, (n=2; 5 réplicas).

La capacidad de diferenciación celular de los mioblastos primarios de ambas formas de ELA, esporádica y familiar, está disminuida en comparación con los mioblastos primarios del control, según los valores analizados del índice de fusión. En el primer ensayo se han tratado durante 8 días con el inhibidor de FoxO a 33 nM, los mioblastos control y los mioblastos del paciente con la forma esporádica. Tras este periodo de tratamiento continuado, el índice de fusión en los mioblastos control no aumenta significativamente, manteniéndose en un 78% de fusión en ambos casos. Sin embargo, los mioblastos del paciente 1 (forma esporádica) presentan un aumento en este

índice que va desde un 15, 23% hasta un 31,73%, duplicando su capacidad de diferenciación de forma significativa (**figura 5.12**). En un segundo ensayo con las mismas condiciones que las anteriores, se ha medido el índice de fusión de los mioblastos del paciente con ELA familiar respecto los mioblastos control tratados con el inhibidor de FoxO. En este caso, al igual que los mioblastos del paciente con ELA esporádica, los mioblastos tienen, de forma significativa, una menor capacidad de diferenciación reflejada en un índice de fusión del 16,5% con respecto al 44% de los mioblastos control. Asimismo, el efecto del inhibidor sobre los mioblastos control no es significativo pero sí que produce una activación significativa de la fusión celular desde un 16,5% hasta un 33%, (**figura 5.13**), duplicando así la capacidad de diferenciación de mioblastos a miotubos, tal y como ocurre en los mioblastos de la forma esporádica. Se puede observar este efecto del inhibidor de FoxO en la capacidad de diferenciación en la **figura 5.14**, en la que la MyHC (verde), marcador de miotubos, aumenta su expresión.

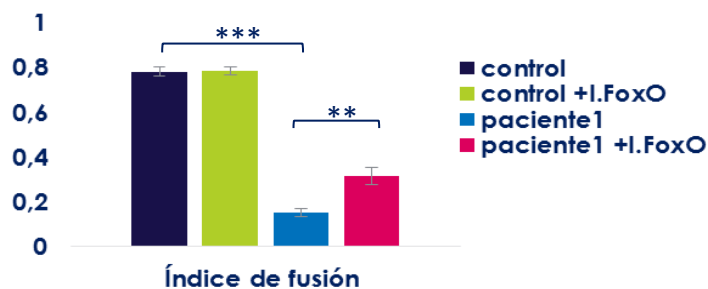


Figura 5.12. Efecto del inhibidor de FoxO en mioblastos control y mioblastos de paciente con ELA esporádica. Prueba t-Student (5 réplicas) *p<0,05. **p<0,01. ***p<0,001.

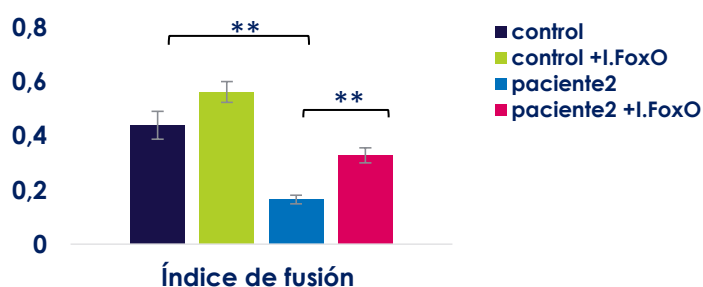


Figura 5.13. Efecto del inhibidor de FoxO en mioblastos control y mioblastos de paciente con ELA familiar. Prueba t-Student (5 réplicas) *p<0,05. **p<0,01 ***p<0,001.

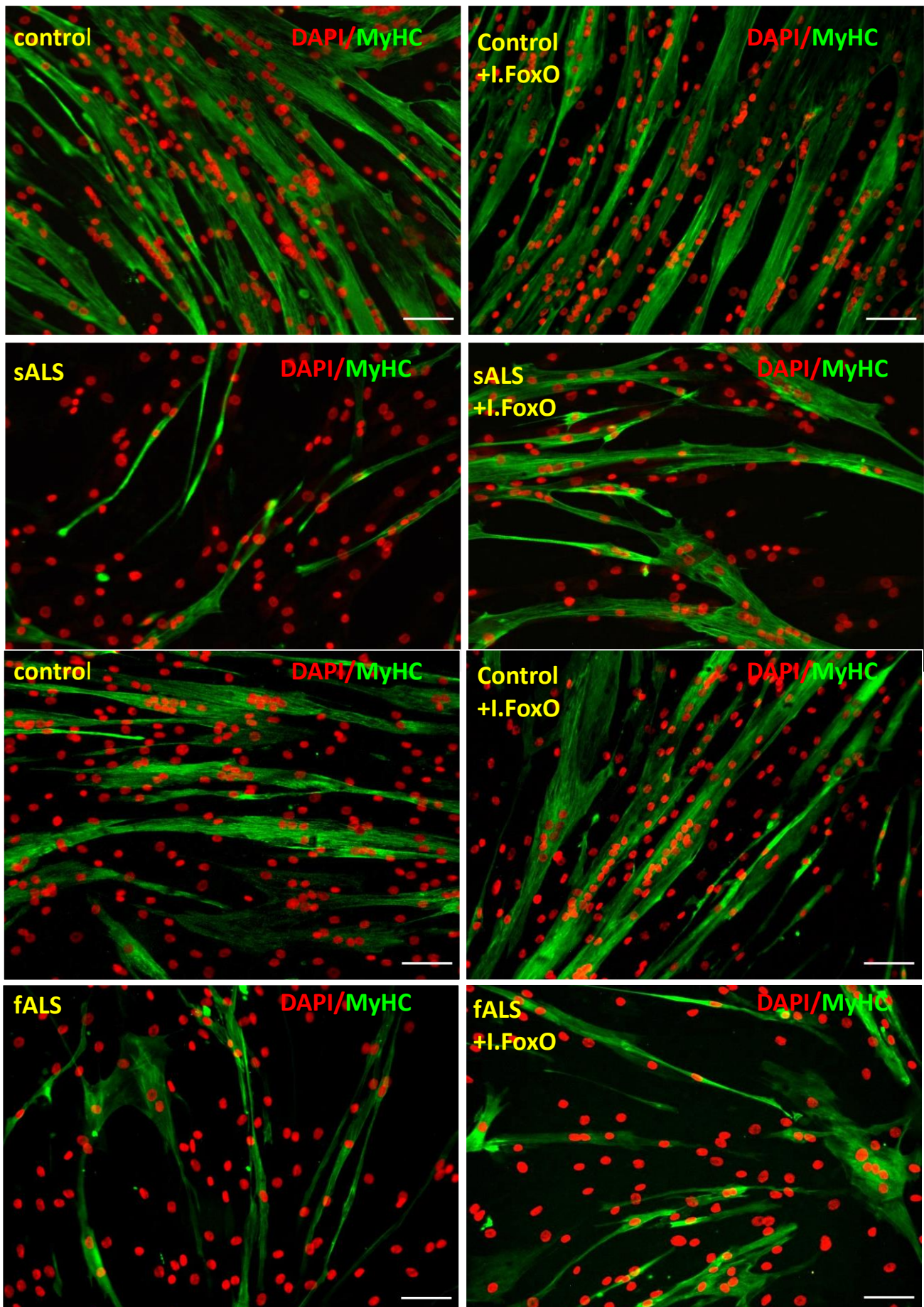


Figura 5.14. Inmunofluorescencia de los mioblastos primarios control y de pacientes. MyHC (verde) y DAPI (rojo; color digitalizado), tras el tratamiento inhibitorio de FoxO. Escala 38 μ m.

5.3. El silenciamiento de *FOXO* en el núcleo restaura el fenotipo de diferenciación en líneas silenciadas al igual que el inhibidor AS1842856

Otro método para demostrar que los factores FoxO podrían ser una diana de tratamiento en los modelos de silenciamiento de *TARDBP* y *FUS*, en los que se asocia la pérdida de función de estos genes con la etiopatogenia de la ELA, es utilizar el mismo mecanismo de silenciamiento de estos genes para los factores FoxO; los *short hairpin RNA (shRNA)*. En el caso de FoxO, la secuencia oligonucleótido específica hibrida de forma complementaria al mRNA de los factores FoxO formándose una hebra doble que es reconocida por la proteína Dicer y se pone en marcha su degradación. De esta manera, no se traduce el mRNA de los factores FoxO en sus respectivas proteínas. En la **figura 5.15**, según la cuantificación con ImageJ de la inofluorescencia de FoxO1 (blanco/verde) y DAPI (rojo), se observa una disminución muy significativa de expresión de FoxO1 nuclear en los dobles silenciamientos shTDP43/shFOXO y shFUS/shFOXO con respecto a los silenciamientos simples shTDP43 y shFUS. Asimismo, la expresión de FoxO1 nuclear es significativamente mayor en shTDP43 y shFUS con respecto a la línea control shRNA, tal y como se había afirmado en experimentos anteriores diferentes. Por eso, el silenciamiento de FoxO se ha producido correctamente y los efectos observados en los sucesivos experimentos con estas líneas silenciadas, son el resultado de dicho silenciamiento. Por otro lado, en la **figura 5.16**, se puede ver el silenciamiento de *TARDBP* y *FUS* tanto en los silenciamientos simples como en los silenciamientos dobles, es decir, en las células en las que el silenciamiento de *FOXO* atcúa como tratamiento. Sorprendentemente, el silenciamiento de *TARDBP* produce un descenso en la expresión de la proteína *FUS*. El silenciamiento de *FOXO* sobre las células silenciadas para *TARDBP*, genera un aumento en la expresión de *FUS*. Este hecho, indica que la bajada de los niveles de *FUS* en shTDP43 puede provenir de la activación de FoxO. Por eso, el silenciamiento de FoxO podría producir un aumento de *FUS* en shTDP43. Con respecto al control shRNA, el