

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

# Caracterización in vivo de la influencia del silenciamiento de genes mendelianos causantes de ELA en Glia.

In vivo characterization of the influence of the silencing of ALS-causing Mendelian genes in Glia.

## RESUMEN

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) es una de las enfermedades neurodegenerativas con mayor prevalencia y de las más incapacitantes a nivel mundial. Se trata de la enfermedad de degeneración de motoneurona más frecuente, causando un rápido deterioro de la vía piramidal. A día de hoy, no existen terapias efectivas para frenar el desarrollo de la enfermedad. Cerca de 10 % de los casos son de origen genético, donde destacan principalmente las mutaciones de los genes FUS y TARDBP, en especial esta última, dado que codifica la proteína TDP-43. El 90% de los casos son de origen esporádico. Actualmente, la etiopatología de la enfermedad se considera desconocida y aunque la degeneración de la motoneurona es el evento clave para desarrollar la enfermedad, está bajo debate si la degeneración de la motoneurona parte de sí misma o si los otros integrantes de la unión neuromuscular pueden contribuir e incluso provocar dicha degeneración. Por lo tanto, las células musculares, así como las células de la glía (astrocitos... etc.) podrían inducir al menos en parte eventos patológicos que afectan a la motoneurona y por lo tanto al desarrollo de la enfermedad. Por eso, el objetivo último de este proyecto es estudiar el efecto del silenciamiento de dichos genes en el desarrollo y etiología de la enfermedad y demostrar si el silenciamiento de estos genes en células de la glía podría contribuir y/ o causar a la degeneración de motoneurona. El análisis de esta hipótesis se realizará mediante la caracterización de modelos de *Drosophila melanogaster* con silenciamientos de genes ortólogos de TDP-43 (*Tbph*) y FUS (*Caz*) dirigidos a glía específicamente, además de valorar el efecto de una posible terapia con inhibidores de FoxO como protector de estas alteraciones, debido a que esta diana ha sido identificada anteriormente por el laboratorio donde se ha realizado este trabajo de investigación. Los resultados obtenidos muestran un déficit significativo en los modelos sin tratamiento en comparación con el control, tanto en capacidad motora como en longevidad. En cambio, los primeros datos en los ensayos con tratamiento no demuestran una mejora significativa en la capacidad locomotora, a pesar de que todavía estén por completar los resultados del estudio de longevidad. El presente trabajo fin de grado constituye una fase inicial pero clave para la consecución final del proyecto, la caracterización de los modelos propuestos y selección de aquellos que mejor recuerdan las características de la enfermedad. Además, la caracterización exitosa de estos modelos nos ha permitido comenzar el primer estudio de eficacia farmacológica en ellos y utilizarlos para lo que se pretendía al inicio del proyecto, por un lado, para estudiar la relevancia de la glía en la enfermedad y por otro, la identificación de modelos animales válidos para testar nuevas terapias innovadoras.

## 1. INTRODUCCIÓN

### Key points

- La ELA es una de las principales causas de neudegeneración a nivel mundial.
- Los genes TDP-43 y FUS son los más implicados.
- El estudio de la glía como participante en el origen de la enfermedad es una vía de estudio en auge.
- La terapia con inhibidores de FoxO ha obtenido resultados interesantes en modelos animales y celulares.

Figura 1. Puntos de interés.

### 1.1 EPIDEMIOLOGÍA

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es la enfermedad neurodegenerativa asociada a motoneurona más frecuente a nivel mundial, siendo una de las principales causas de neurodegeneración y dependencia precoz en nuestro entorno. En Europa, la ELA tiene una incidencia aproximada de 2.1-3.8 por 100.000 por año y una prevalencia cercana al 5-7 por 100.0000 habitantes<sup>5</sup>. En los últimos 25 años ha crecido la prevalencia y de la incidencia de la enfermedad, asociado principalmente a una mayor supervivencia de los pacientes y a la mejor capacidad diagnóstica. Existen, además, algunos clusters geográficos de interés en el sur de Asia, en concreto en Guam, Nueva Guinea y la península de Kii en Japón, donde la proporción de pacientes con ELA supera con creces la de otras poblaciones<sup>5,6</sup>. Existe también cierta variación en la historia natural de la enfermedad, ya que en estos clusters la supervivencia aumenta mucho (alrededor de 48 meses) en comparación con la supervivencia en Europa (24 meses) una vez es diagnosticada la enfermedad<sup>6</sup>.

### 1.2.MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Las **manifestaciones clínicas** podemos dividir las según la motoneurona afecta. Las lesiones en el tracto inferior o segunda motoneurona causa debilidad, atrofia y fasciculaciones en las extremidades y la musculatura bulbar. Las lesiones en el tracto superior o primera motoneurona causan hiperreflexia en los miembros atroficos, espasticidad y en ocasiones, signo de Babinski. Del mismo modo, es posible encontrar lesiones a nivel bulbar, causando parálisis pseudobulbar con labilidad emocional, reflejo mandibular aumentado, enlentecimiento de la movilidad lingual y dificultad en el habla<sup>1,2,8</sup>.

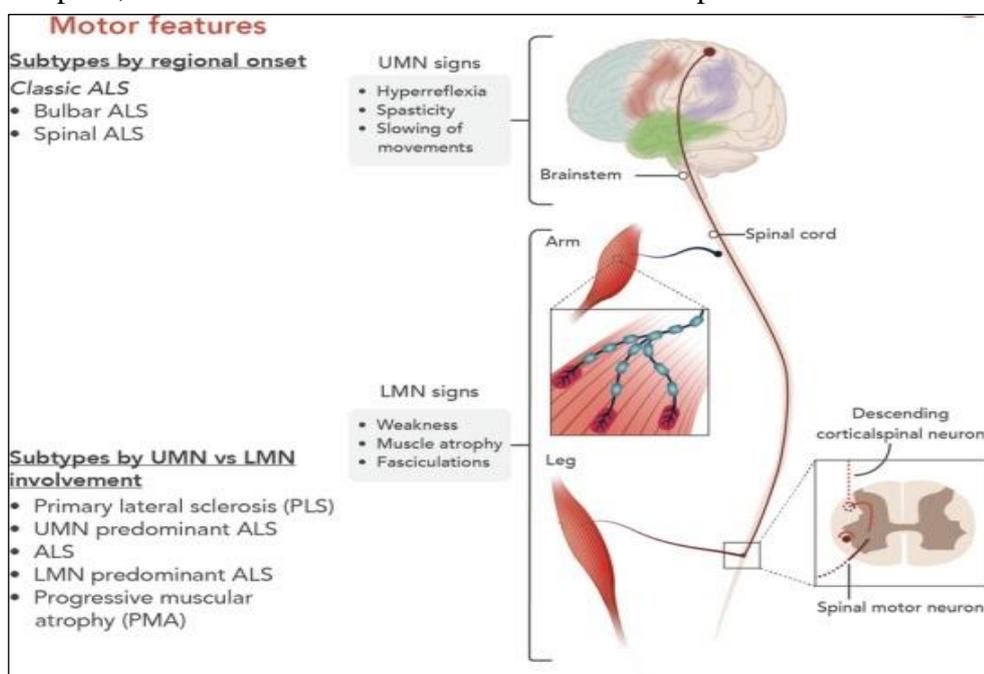
Característicamente, en esta patología no suele haber afectación del sistema autónomo ni de las ramas sensitivas, como es el control de esfínteres. La capacidad contráctil de la musculatura cardiaca y la musculatura extraocular también suelen estar preservadas<sup>4,8</sup>. La aparición de sintomatología autonómica suele darse en etapas tardías de la enfermedad, principalmente como urgencia urinaria, estreñimiento o incluso estados de hiperhidrosis. La aparición de dolor suele estar relacionado con la

falta de movilidad, los calambres o la espasticidad muscular. En ocasiones, puede aparecer dolor neuropático<sup>1,2</sup>.

Existen otros síntomas menos frecuentes relaciones especialmente con el estado cognitivo, pudiendo aparecer incluso en el debut sintomatológico, a veces siendo reportado por parte de los familiares. Varios estudios han demostrado que entre el 5-27% de los casos, en el momento del inicio del cuadro pueden ocurrir signos claros de demencia frontotemporal (DFT), con alteraciones del comportamiento, del autocontrol o cambios en la personalidad, además de alteraciones en las funciones ejecutivas, en el lenguaje y en la fluidez de la escritura<sup>1,2,3</sup>.

Basándonos en el momento de aparición de la clínica, podemos **estratificar** a los pacientes según el orden cronológico de aparición de las lesiones prioritarias<sup>1</sup>:

- Afectación en los miembros (75-80% de los casos): Debilidad muscular indolora, torpeza (caída de objetos, pérdidas del ortostatismo), deterioro en la motricidad fina (escribir), rigidez en las extremidades, alteraciones de la marcha, estadios de pie/muñeca caída.
- Pacientes con afectación bulbar (20-25% de los casos): Alteraciones del habla o disartria, clínica pseudobulbar (Risa o llanto inapropiado e involuntario), disfagia con/sin pérdida de peso, babeo, atragantamiento y asfixia.
- Pacientes con clínica respiratoria (menos del 3% de los casos): disnea progresiva, ortopnea, insomnio e hipersomnia diurna.



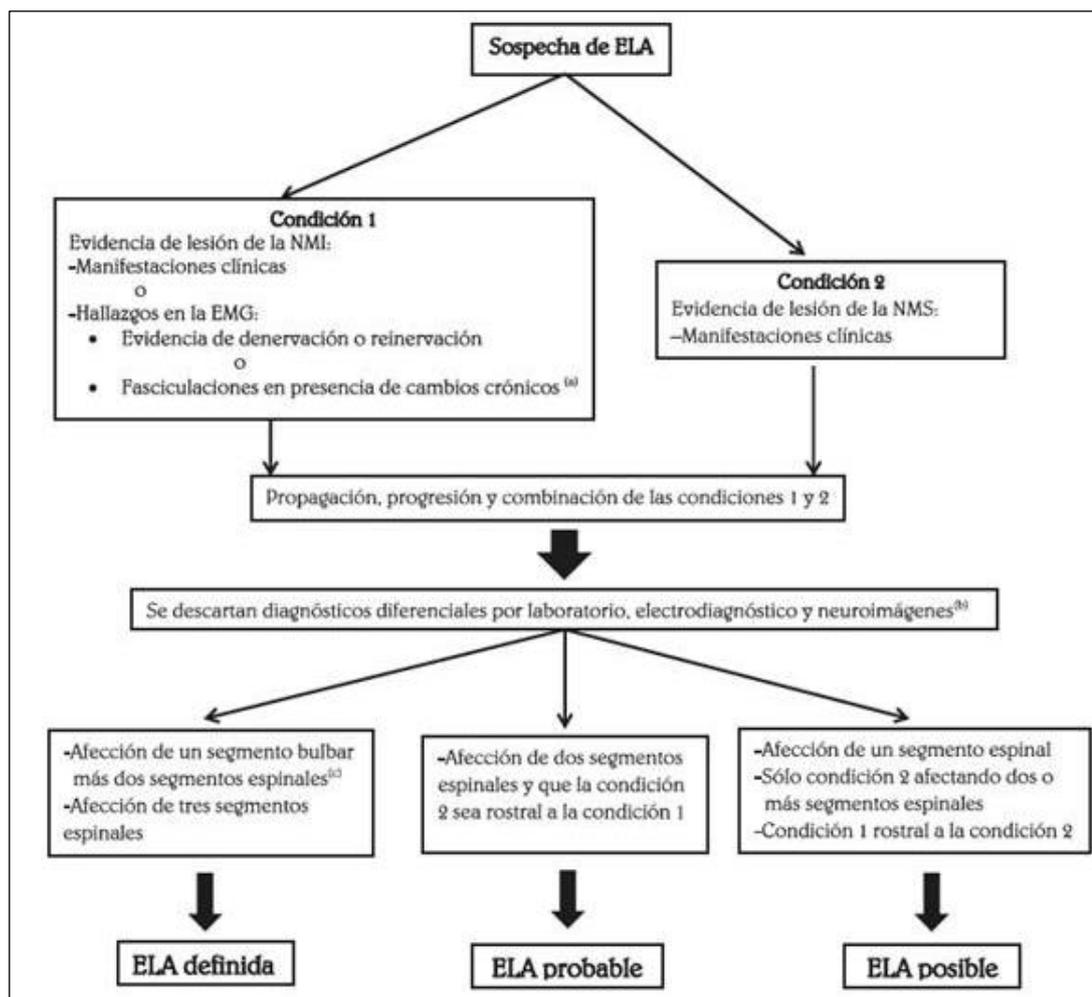
**Figura 2. Presentación fenotípica de la ELA<sup>8</sup>.** La clínica es distinta si la afectación es de primera o de segunda motoneurona, pero puede aparecer de manera conjunta. Del inglés, UMN: Primera motoneurona. LMN: Segunda motoneurona.

**El debut** de la enfermedad suele comenzar en el 75% de los pacientes con predominio distal, focal y asimétrico<sup>3</sup>, afectando principalmente a los miembros para posteriormente extenderse siguiendo un recorrido anatómico ascendente. Los primeros síntomas en aparecer suelen ser debilidad, torpeza e incluso atrofia de la musculatura distal, muchas veces precedido de calambres musculares. En las extremidades superiores se ven afectados la musculatura intrínseca de la mano y los musculo tenares, mientras que, en las extremidades inferiores, suele iniciarse con un patrón piramidal (mayor debilidad en la musculatura flexora), siendo frecuente la afectación precoz de la flexión de la cadera y la dorsiflexión del tobillo. Esta sintomatología suele representar un aumento de la torpeza (caída de objetos, pérdidas de ortostatismo), deterioro de la motricidad fina (escribir), alteraciones de la marcha o la aparición de síndrome mano/pie torpe. En etapas tardías es común la afectación de la musculatura más proximal, donde destaca la afectación del tríceps y los flexores de los dedos. En los cuadros que debutan con afectación bulbar (cerca del 25% de los casos), podemos encontrar afectación de los pares craneales que regulan la acción muscular voluntaria; así, podemos encontrar afectado el XII par (atrofia y/o fasciculaciones de la lengua), afectación del V par (reflejo mandibular hiperactivo) y afectación del VII par (ptosis, sialorrea, debilidad y/o espasmos en la musculatura facial).

El **progreso** de la enfermedad es **extremadamente variable**<sup>1,3,8</sup>, aunque en la mayoría de los casos sigue un curso fulminante. El desarrollo de la enfermedad suele seguir un patrón lineal y constante con periodos de remisión o exarberación. La sintomatología suele progresar a través de los segmentos ya afectados hacia otras regiones; comúnmente, los pacientes con afectación unilateral de una extremidad suelen mantener un progreso ipsilateral hasta llegar a afectar al lado contrario, para posteriormente afectar al resto de extremidades siguiendo el mismo patrón. Este proceso ocurre indiferentemente de que el debut sea con clínica motora o de afectación bulbar. Finalmente, en la mayoría de los casos, en fases terminales la disfunción motora afecta a las cuatro extremidades y a la musculatura bulbar de manera conjunta.

Las principales **complicaciones** son la disfagia y el fallo neuromuscular respiratorio, siendo este último el más común y la principal causa de muerte en pacientes con ELA<sup>1,2,3</sup>. En el caso de la disfagia, la aspiración de comida, líquidos o secreciones y/o el atragantamiento son los principales factores de riesgo vital.

### 1.3.DIAGNÓSTICO



**Figura 3. Algoritmo diagnóstico de ELA según criterios de El Escorial Revisado y con modificaciones del consenso Awaji-Shima.** <sup>a</sup>Aporte del consenso Awaji-Shima a los criterios electrodiagnósticos. <sup>b</sup>Principales diagnósticos diferenciales: intoxicación por metales pesados, síndrome neurovascular, esclerosis múltiple, compresión medular, trastorno carencial, mononeuritis múltiple, neuropatía motora multifocal, atrofia muscular espinal, atrofia muscular espinal bulbar (enfermedad de Kennedy), amiotrofia focal benigna, síndrome pospolio. <sup>c</sup>Segmentos espinales: cervical, torácico y lumbosacro. ELA (esclerosis lateral amiotrófica), NMI (neurona motora inferior), NMS (neurona motora superior) y EMG (electromiografía).

No existe una prueba específica para determinar la enfermedad, el criterio clínico prevalece junto con las pruebas complementarias a la hora de dar un diagnóstico definitivo, descartando que no se trate de otra patología. Esto conlleva a que en la mayoría de los casos exista un retraso significativo al diagnóstico. A día hoy, el algoritmo diagnóstico de referencia es el establecido mediante los criterios de El Escorial<sup>3</sup> (figura 3). Otras guías utilizando un criterio de referencia anatómica para el diagnóstico, dividiendo así la afectación en cuatro regiones (bulbar, cervical, torácica y lumbosacra)<sup>1,2,8</sup>. Si aparece clínica compatible en 3 de esas regiones, el diagnóstico se considera definitivo.

Las principales pruebas diagnósticas disponibles hoy en día serían los siguientes<sup>1,2,3</sup>:

- Electromiograma: Es la prueba complementaria de mayor relevancia. Esta prueba nos permite valorar el estado de afectación neural de los músculos clínicamente afectados. Dentro de las alteraciones destaca el patrón neuropático, indicando la denervación muscular y la presencia de fasciculaciones asociadas al cuadro clínico.
- Estudios de conducción nerviosa: En el caso de la ELA suelen resultar normal.
- Determinación en líquido cefalorraquídeo: Normal.
- Neuroimagen: Normal, preferentemente RM cerebral. Los estudios con PET (FDG-F<sup>18</sup>) pueden revelar patrones típicos de hipometabolismo en regiones rolándicas y frontotemporales.
- Estudios analíticos incluyendo CK: Normal.
- Estudios de autoinmunidad:
  - Anticuerpos antiGM1: Grupo de anticuerpos relacionados con cuadro de neuropatía motora multifocal, muy poco frecuentes en pacientes ELA.
  - Anticuerpos antirreceptor de acetilcolina: Permiten el diagnóstico diferencial con *Miastenia gravis*.
- Biopsia muscular: Atrofia neurógena en evolución. Únicamente indicada en casos atípicos.
- Pruebas de función respiratoria: Deben realizarse a todos los pacientes.

El análisis genético basado en biomarcadores puede jugar un papel crucial en el diagnóstico. Son potencialmente importantes para clasificar a los pacientes y monitorizar los efectos del tratamiento en los ensayos clínicos, aunque actualmente no están integrados en la práctica clínica habitual. Algunos biomarcadores como los niveles de neurofilamentos en LCR son especialmente útiles, sobre todo en pacientes de debut reciente con debilidad muscular<sup>1,2,3</sup>.

#### **1.4.SCREENING Y PREVENCIÓN**

Es importante identificar a la población de riesgo, siendo los familiares de pacientes los más afectados<sup>1,3,7</sup>, a quienes se les recomienda un estudio genético para identificar el riesgo. En casos de alto riesgo, se podría recomendar el consejo genético preconcepcional<sup>3</sup>.

Existe una clara evidencia a favor de la abstinencia y el abandono del tabaco como medida de prevención<sup>1,2,3</sup>.

## 1.5.PRONÓSTICO

El pronóstico de la enfermedad es fatal<sup>2,6,8</sup>, con una vida media, dentro de nuestra población de referencia, en el 50% de los casos no superior a los 3-5 años desde debut sintomático, siendo solo del 2% la supervivencia de entre 5-10 años. La supervivencia por encima de los 20 años es posible pero rara.

Las principales causas de muerte están asociadas a las complicaciones<sup>1,2,3</sup>, especialmente a la insuficiencia respiratoria terminal y al riesgo de aspiraciones asociado a la disfagia. El pronóstico empeora en los casos que debutan con afectación bulbar, afectación mayoritaria de motoneurona inferior, en debut con cuadro de demencia y en los casos familiares. El pronóstico mejora con diagnósticos precoz (antes de los 40 años), síntomas en una única extremidad o en pacientes con cierto grado de obesidad. Cuando mayor sea retraso diagnóstico, el pronóstico de la enfermedad es más insidioso.

## 1.6.TRATAMIENTO

A día de hoy no se dispone de un tratamiento eficaz ni de ningún tratamiento etiológico<sup>1,2,3</sup>. El mejor tratamiento se obtiene en centros especializados que puedan brindar cuidados multidisciplinarios. El tratamiento actual tiene como objetivo maximizar la supervivencia del paciente, previniendo el inicio de la caquexia y evitando las principales complicaciones. Es importante controlar el riesgo de depresión y la aparición de demencia, facilitando la movilidad y evitando el encamamiento prolongado. Las líneas de tratamiento utilizadas actualmente son<sup>7</sup>: fármacos antiespásticos (baclofeno), tratamiento rehabilitador y de foniatría, fisioterapia respiratoria, medidas de soporte para la deglución, posibilidad de gastrostomía percutánea, apoyo respiratorio con ventilación mecánica no invasiva, tratamiento de la sialorrea (toxina botulínica, anticolinérgicos)...

Existen varias líneas de tratamientos con el fin de ralentizar la evolución de la enfermedad, donde el fármaco más estudiado es el Riluzole (inhibidor de la transmisión glutamatérgica), con un efecto moderado en aumentar la supervivencia (aumento aproximado de 3-6 meses al administrar 50mg/2 veces al día<sup>1,2,3,8</sup>). El Edaravone fue aceptado en 2017 por la FDA gracias a un estudio en fase II, obteniendo resultados al disminuir la necesidad de atención clínica (medida en base a la escala ALSFRS-R) tras 6 meses de tratamiento. De todas maneras, el Edaravone no ha sido aprobado para su uso en la Unión Europea. Otro medicamento en estudio es el masitinib, un inhibidor tirosin-kinasa, utilizado como co-terapia junto Riluzole sugiere efectos positivos al disminuir el ALSFRS-R en pacientes con progresión<sup>8</sup>.

## 1.7. ETIOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO

La gran mayoría de los casos (90%) son de carácter esporádico, frente al 10% de los casos que son familiares, estos últimos apareciendo a edades más tempranas. El debut sintomático ronda en torno a los 55-65 años dentro de la población europea, aunque existen casos reportados incluso en adultos más jóvenes cercanos a los 40 años, sobre todo en relación a casos familiares<sup>2,8</sup>.

Se trata de una enfermedad de origen multifactorial. Se estima que, tanto en los cuadros esporádicos como en los casos familiares, la enfermedad se desencadena al combinar la exposición a factores ambientales y la existencia previa de labilidad genética. Existe un estudio poblacional que mediante el uso de un modelo matemático indica que el proceso de génesis de la enfermedad sigue una estructura a *pasos*, siendo estos unos 5-6 basados en la combinación de factores genéticos y ambientales. De esta manera, estos *pasos* determinarían el inicio de la enfermedad, la gravedad y los posibles síntomas<sup>5</sup>.

Los factores de riesgo más estudiados<sup>1,2,3</sup> son la edad avanzada (principalmente en adultos mayores de 60 años), el sexo masculino (1.6:1 sobre el femenino) y la susceptibilidad genética, lo que habla a favor de que la incidencia sea mayor en regiones occidentales como en Europa o Estados Unidos, donde podemos encontrar una población más envejecida, predominantemente masculina y con una mayor carga genética heredada a lo largo de generaciones.

A día de hoy, existen varias líneas de investigación que estudian otros posibles factores genésicos de la enfermedad<sup>1,2,3,7</sup>. Varios estudios apuntan a la influencia de metales pesados, como el mercurio, selenio y plomo, y la exposición crónica a pesticidas como elementos predisponentes de la enfermedad dada su neurotoxicidad. Se ha reportado una mayor frecuencia de casos en deportistas de élite en comparación con la población general, lo que podría llevar a la actividad vigorosa e intensa a ser un factor de riesgo notable. Otras líneas hablan de la relación de cianobacterias en aguas o la exposición a cianotoxinas como posibles factores asociados. De otra manera distinta, podemos encontrar situaciones que en varios estudios han demostrado tener cierto papel protector, como es el caso del uso de anticonceptivos orales o pacientes con cuadros de dislipemias o diabetes mellitus tipo 2<sup>1,2,3</sup>.

## 1.8.BASE GENÉTICA DE LA ENFERMEDAD

Se han identificado al menos 30 locis<sup>2,3</sup> relacionados con un mayor riesgo de aparición de ELA. La existencia de estos genes varía según el origen de la enfermedad; así, en los casos familiares la herencia suele respetar patrones mendelianos mientras en los casos esporádicos suelen actuar como genes de baja penetrancia. Para el desarrollo de este trabajo, destacan principalmente:

- TARDBP: Gen encargado de codificar la proteína TDP-43. Se trata de una proteína altamente conservada que se expresa en el núcleo, actuando como transcriptor y procesador de RNAs y tomando parte en el transporte de los mismos al citoplasma<sup>46,47</sup>. A pesar de ello, TDP-43 puede migrar al citoplasma formando gránulos de estrés silenciando el RNAm unido a esta proteína durante situaciones de estrés<sup>48</sup>, como ocurre con la ELA. De esta forma, TDP-43 causa la patogénesis de la enfermedad por dos vías: Por un lado, causa una pérdida de **función nuclear**. Por otro lado, genera una **ganancia de función tóxica citoplasmática**. Ambos factores contribuyen de igual manera<sup>49</sup>. Finalmente, la proteína TDP-43 se une a transcritos tipo FUS, VCP o progranulina que codifican otras proteínas asociadas a enfermedades neurodegenerativas<sup>50</sup>.
- FUS: Gen encargado de procesos celulares como regulación de la transcripción y transporte de RNA, reparación del DNA y respuesta al daño<sup>51</sup>. En los pacientes ELA provoca principalmente degeneración de motoneurona inferior, sin afectación bulbar ni cognitiva, aunque se ha asociado a pacientes con ELA familiar asociada a DFT<sup>52</sup>.

TDP-43 y FUS llevan a cabo el procesamiento de múltiples RNAs e interaccionan físicamente a la hora de regularlos. Por otra parte, en modelos de *Drosophila melanogaster* se han visto similitudes en el perfil transcriptómico de ambas proteínas, sugiriendo una colaboración entre ambas.

La evaluación genética afecta a la patogénesis de la enfermedad incluso en los casos esporádicos<sup>2,3</sup>. Existen varias líneas de investigación sobre factores epigenéticos en la aparición de casos esporádicos. En modelos genéticos con ratones, se ha demostrado que los astrocitos normales pueden proteger a las motoneuronas de la expresión de genes mutados y que la eliminación de la expresión del mismo por los astrocitos y la microglía podría enlentece el progreso de la enfermedad<sup>54</sup>. De la misma manera, la presencia del gen mutante en estas células podría ejercer efectos nocivos en las motoneuronas adyacentes<sup>41</sup>.

## 1.9. ETIOPATOGENIA

Clásicamente, las enfermedades neurodegenerativas en su integridad, como es el caso de la ELA, han sido explicadas como una degeneración del tejido neuronal que acarrea consigo la degeneración completa del sistema que conformasen. En concreto, en la ELA la degeneración intrínseca y progresiva de la motoneurona a cualquiera de sus niveles se ha establecido como el elemento directamente implicado en la disminución de la capacidad motora y en la atrofia muscular en estos pacientes.

Actualmente, los hallazgos establecidos hasta la fecha han determinado que la degeneración de la motoneurona es esencial para generar el cuadro clínico, pero no lo único, ya que se han demostrado alteraciones significativas en el resto de tejidos integrantes de la unión neuromuscular (UNM), como es el caso del propio tejido muscular esquelético (La ELA no cursa con afectación del tejido muscular liso) y en el tejido astrocitario acompañante. Esto ha permitido dirigir el foco de la investigación hacia nuevas hipótesis sobre el origen del deterioro, centrando el interés en los diferentes tipos celulares de la UNM y las interacciones entre ellos y por tanto defendiendo el origen patogénico alternativo de la ELA<sup>45</sup>.

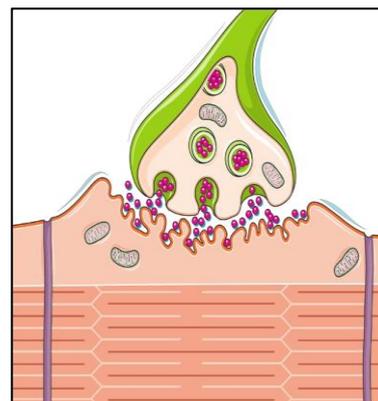


Figura 4. Representación gráfica de la unión neuromuscular clásica.

De esta manera, hoy por hoy uno de los mayores ejes donde se centran las investigaciones presentes se basan en conocer la implicación del tejido muscular y del tejido astrocitario en su relación con la motoneurona. Dando por sentado que en los cuadros de ELA la degeneración de la motoneurona está garantizada, el objetivo actual es conocer si esta degeneración ocurre primariamente o, por el contrario, requiere la participación inequívoca de degeneraciones acompañantes en el resto de la UNM.

El consumo energético generado por las neuronas hace del papel de la glía, como elemento encargado de mantener la homeostasis energética de las mismas, una labor fundamental para la obtención de energía de las neuronas. Dado que el consumo energético de las neuronas es principalmente oxidativo, son los astrocitos los que se encargan de proporcionar el substrato glucolítico al proceso<sup>45</sup>, lo que convierte al tejido astrocitario en un foco importante para el estudio de enfermedades neurodegenerativas.

En la línea de investigación que se centra este TFG, la implicación del tejido astrocitario ha resultado de gran interés debido a su papel por excelencia como soporte

nutricional y metabólico directo de la neurona, ya que varios estudios han reportado un efecto directo en la alteración de la glucólisis en relación con la degeneración en la motoneurona<sup>29,30,34,38</sup>, resultados que también han sido comprobados en nuestro propio laboratorio<sup>14,15</sup> y orientan hacia la importante implicación del tejido glial en el desarrollo de la degeneración. De todas maneras, el debate sobre su capacidad autónoma de generar la toxicidad necesaria para generar el cuadro está actualmente en discusión, por lo que resulta necesario continuar la investigación de dicha implicación en nuevos proyectos de investigación.

Los hallazgos sincrónicos de TDP-43 y FUS<sup>1,2,3</sup> en pacientes de ELA favorecen la hipótesis que implica la aparición de estas proteínas mutadas como principal vía etiopatogénica de la enfermedad. Además, la proteína TDP-43 mutada ha demostrado una unión mejorada a FUS/TLS no mutado, favoreciendo la implicación de TDP-43 en interrumpir el funcionamiento normal de FUS sugiriendo así una convergencia en sus mecanismos patogénicos de ELA. Estas mutaciones no aparecen únicamente dentro de las neuronas motoras: la implicación de las células no neuronales ha demostrado ser necesaria para generar la enfermedad. En ratones quiméricos con ELA, la expresión aislada de estos genes en las motoneuronas no fue suficiente para causar la muerte de las mismas, requiriendo su expresión concomitante en glía<sup>54</sup>. En muestras con neuronas wildtype, estas sufrieron degeneración al estar rodeadas de astrogliá con mutación<sup>42</sup>. De la misma manera, en muestras con neuronas mutadas rodeadas de astrogliá wildtype se demostró un aumento de supervivencia de las motoneuronas y el incremento del tiempo libre de enfermedad<sup>42</sup>. Estos hallazgos juegan un papel importante al determinar que el origen de la enfermedad no requiere de una participación autónoma de la motoneurona, si no que parece requerir la implicación del resto de tejidos de la Unión Neuromuscular para generar el cuadro.

Histopatológicamente, El hallazgo de inclusiones intracelulares es muy frecuente y una de las características más importantes de la ELA<sup>2</sup>, estando estas inclusiones formadas principalmente de TDP-43 (especialmente en los casos esporádicos) asociada a mutaciones de sobreexpresión en el gen TARDBP, encargado de codificar dicha proteína. Estos hallazgos sugieren una importancia fundamental de la proteína TDP-43 en la patogénesis de la ELA. Normalmente, estas proteínas favorecen el ensamblaje del RNA en gránulos de estrés, estructuras que favorecen la regulación en la síntesis proteica ante la respuesta al estrés. Las mutaciones en estas proteínas pueden promover la incorporación de la misma a los gránulos de estrés haciéndolos resistentes a la degradación y favoreciendo su agregación y/o el ensamblaje anormal del RNA y con ello, favoreciendo la aparición de las inclusiones citoplasmáticas<sup>53</sup>.

### 1.10. DROSOPHILA MELANOGASTER EN INVESTIGACIÓN

La utilización de *Drosophila Melanogaster* o mosca de la fruta está muy extendido en el estudio de la genética y la herencia<sup>9</sup>. Su utilidad radica principalmente en la capacidad de reproducción de patrones genéticos humanos en sus genes ortólogos, dado que aproximadamente el 75% de los genes causantes de enfermedad en humanos tiene su homólogo en mosca. Además, la facilidad de manipulación del genoma en *Drosophila* y la presencia de una dotación genómica poco redundante facilitan su uso en este aspecto.

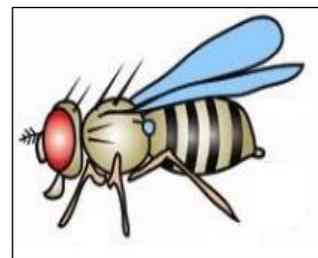


Figura 5 Modelo gráfico de *Drosophila melanogaster*<sup>9</sup>.

A nivel técnico, el modelo de mosca es especialmente útil debido a varios factores<sup>9</sup>:

- Su facilidad de almacenamiento, ya que no requieren espacios amplios para su desarrollo permitiendo mantenerlas dentro de tubos de ensayo, que a su vez pueden almacenarse formando *stocks* en incubadores.
- El conocimiento adquirido a lo largo de años de investigación, que ha permitido crear grandes bases de datos y con ellas, el desarrollo de técnicas de manipulación genética cada vez más eficaces. Es importante aclarar que no existen requerimientos legales para la investigación en estos modelos animales.
- Las características propias de la mosca la convierten en un modelo ideal para la investigación; su ciclo vital corto (tardan alrededor de 10 días en completarse) y su leve complejidad anatómica permiten realizar varias líneas de investigación y en periodos de tiempo más cortos.

Es importante contextualizar que existen diferencias muy significativas entre este modelo y los seres humanos. Por lo que, para potenciar la validez de los estudios realizados utilizando este modelo, es muy importante elegir proyectos en los que las vías de señalización implicadas estén altamente conservadas entre ambas especies. En cualquier caso, es un modelo especialmente válido para realizar un primer testeo farmacológico, aunque las diferencias farmacocinéticas y farmacodinámicas entre las diferentes especies suponen una limitación en la búsqueda de nuevos tratamientos, siendo necesario el testeo de nuevas terapias en especies superiores antes de pasar desde la mosca directamente al humano<sup>12</sup>.

### 1.11. DROSOPHILA COMOMODELO DE ELA

Dada las actuales líneas de investigación de la ELA, resulta de especial interés el conseguir modelos animales que repliquen las mutaciones genéticas de manera eficaz y que sirvan como modelos de referencia. En este proceso, los modelos de *Drosophila melanogaster* han obtenido una relevancia importante, especialmente porque la mayoría de los genes de ELA se mantiene conservados, ofreciendo una fácil

manipulación y facilidad a la hora de generar fenotipos con déficits motores. Tanto es así, que se han podido generar modelos para la gran mayoría de genes estudiados, tanto para los genes homólogos de TARDP (*Tbph*) y FUS (*Caz*), como para otras líneas como C9orf72 o SOD1<sup>40,41</sup>.

En los modelos de *Tbph* y en *Caz*, el silenciamiento genético y el déficit proteico asociado han demostrado ser causantes de deterioro motor<sup>16,17,18</sup> y con ello, de la esperanza de vida de estos modelos. En ambos casos, los fenotipos pueden ser revertidos mediante la sobreexpresión de sus proteínas correspondientes a nivel neuronal, demostrando así que son el resultante de una mala función de la proteína segregada y que las funciones de TDP-43 se conservan y son recuperables. De la misma manera, los modelos estudiados con sobreexpresión wild-type y/o mutante de dichas proteínas han demostrado ser también causantes de deterioro motor y de esperanza de vida<sup>16,17</sup>.

En el caso de la glía, se han generado varios enfoques distintos de investigación en este campo, especialmente orientados en investigar los principales genes implicados: los genes *Caz* (Homólogo de FUS) y *TBPH* (homólogo de TARDP)<sup>9,10,11,12</sup>. En estos casos, tanto la sobreexpresión como el silenciamiento condicionado y dirigido a tejido astrocitario ha conseguido acarrear un déficit motor significativo con el consecuente decaimiento en la esperanza de vida de las moscas. Este efecto hace pensar que la hipótesis alternativa del origen del ELA centrada en la disfunción conjunta de la UNM, pueda tener una validez primordial. De esta manera, es viable generar modelos animales que reproduzcan con mayor certeza lo que ocurre en el ser humano, donde de nuevo los modelos de *Drosophila* se erigen como una de las opciones más interesantes, ya que han demostrado una reproductibilidad genética muy eficaz, aceptando con facilidad el dirigir estas mutaciones a tejidos concretos como la glía y permitiendo a su vez el poder utilizar estos modelos como métodos para realizar screening farmacológicos.

Centrar la investigación en la implicación e interacción de los distintos tipos celulares de la unión neuromuscular en la patogénesis de la ELA ha resultado ser una vía de estudio muy prometedora, especialmente al investigar la participación de los elementos no neuronales. Dado el papel fundamental que juega la glía en la regulación metabólica de la neurona, el presente trabajo fin de grado pretende estudiar la contribución de la misma en el origen de la ELA mediante la caracterización de modelos de *Drosophila melanogaster* con silenciamientos condicionados para *Tbph* y *Caz* dirigidos a tejido astrocitario, además del posible uso de inhibidores de FoxO como vía terapéutica.

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Al investigar las posibles vías de origen de la ELA, se ha observado el papel primordial que juega la carga genética, especialmente la relacionada con los genes TARDBP y FUS. La unión neuromuscular constituye la placa motora, cuya funcionalidad es clave para la transmisión y comunicación entre el Sistema Nervioso Central y el músculo esquelético. Los principales integrantes de esta placa motora son la motoneurona, el mioblasto y las células de la glía (astrocitos). Las alteraciones asociadas a defectos genéticos en los tipos celulares no neuronales de la unión neuromuscular podrían promover y/o causar efectos tóxicos sobre la motoneurona, y en última instancia su degeneración. Dada la implicación funcional de la glía como elemento coordinador de la obtención de energía por parte de la motoneurona, para el presente proyecto fin de grado hemos decidido realizar un silenciamiento condicionado para los genes ELA en astrocitos.

El objetivo principal de este estudio es evaluar el efecto del silenciamiento específico de genes ortólogos de TARDBP y FUS en células de la glía, mediante la caracterización de modelos *in vivo* de *Drosophila melanogaster*. Estos modelos son especialmente útiles para aportar evidencias experimentales a favor de la participación genética en el origen fisiopatológico y la evolución de la enfermedad, siendo a su vez especialmente útiles para valorar la eficacia de nuevas líneas de tratamiento.

De esta manera, los objetivos concretos del estudio serían los siguientes:

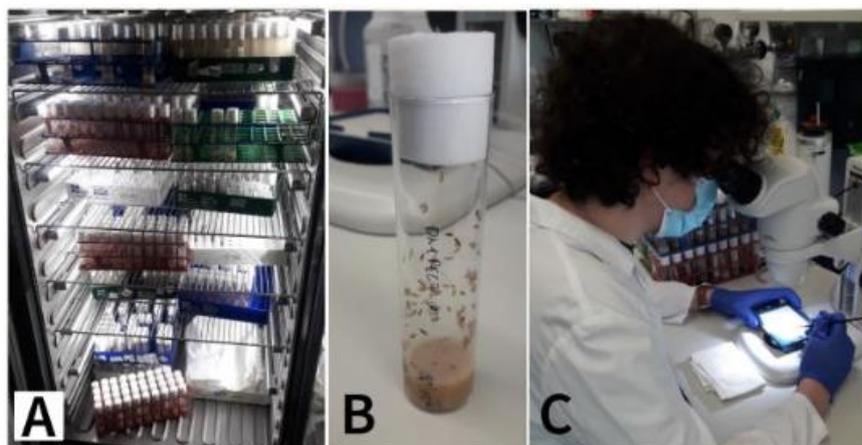
1. Generación de modelos de mosca con silenciamiento selectivo en *Tbph* y *Caz* (Genes ortólogos de TARDBP y FUS respectivamente) en glía.
2. Comprobar mediante técnicas de Biología molecular los genotipos obtenidos.
3. Caracterización fenotípico-funcional de los modelos de mosca con silenciamientos de *Tbph* y *Caz*.
4. Testar la eficacia terapéutica de la inhibición de FOXO1 en el/los modelos seleccionados representativos de la enfermedad.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1.MANTENIMIENTO Y MANIPULACIÓN DEL MODELO *IN VIVO*.

El almacenaje de los modelos de *Drosophila Melanogaster* se realizó en tubos de base plana con una capa de comida (composición: agar 6g/l, levadura 62,5g/l, azúcar 41,6 g/l, harina de maíz 29 g/l y ácido propiónico 4,1 ml/l) previamente elaborada y conservada en cámara a 4°C, siendo esta repartida equitativamente en cada tubo mediante el uso de Droso-Filler (BioLab), sellando posteriormente cada tubo mediante tapones de algodón y depositándolos en gradillas. Cuando no se estaba haciendo uso de ellos, estos tubos se mantenían en una cámara climática en condiciones ideales para su desarrollo (23°C, humedad de 70%, ciclos luz/oscuridad de 12 horas), condiciones que determinan la duración del ciclo vital de la mosca, que como referencia en moscas no transgénicas ronda los 10 días. En caso de almacenarse las moscas a 18°C, este tiempo se duplica<sup>9</sup>.

La manipulación del animal se realizó en bandejas porosas de difusión conectadas a bombonas de CO<sub>2</sub> de alta presión, generando así un estado de sedación en las moscas que facilitó el manejo. Dado su tamaño y la necesidad de caracterización fenotípica, se utilizó una lupa estereoscópica (Nikon SMZ745T) para visualizar correctamente las estructuras anatómicas. Una vez finalizado, las moscas seleccionadas eran devueltas a los tubos correspondientes, siendo el resto desechadas.



**Figura 6.** Almacenaje y manipulación de los modelos de *Drosophila melanogaster*.  
A) Incubador de almacenaje. B) Tubos con moscas en diferentes estados del ciclo vital.  
C) Ejemplo de manipulación de las moscas

### 3.2.OBTENCIÓN DEL MODELO *IN VIVO*

#### 3.2.1. Ciclo vital de *Drosophila melanogaster*

La principal ventaja del uso de *Drosophila melanogaster* como modelo experimental radica en su corto ciclo vital, siendo aproximadamente de 10 días a temperaturas controladas (25°C). Tras la puesta de huevos, el desarrollo embrionario dura aproximadamente 21 horas hasta la formación de la larva, que a lo largo de 3 días experimenta un crecimiento formado por 3 etapas, durante los cuales las larvas requieren una aportación nutricional adecuada.

Durante su fase final, la larva migra a zonas donde, en un periodo de 5 días, puedan completar su transformación en pupa mediante un proceso metamorfoso donde los órganos larvarios son sustituidos por los de la mosca adulta. En nuestro caso, las larvas migran de manera vertical en los tubos. De esta manera, transcurrido aproximadamente diez días, ocurre la eclosión de la mosca adulta desde su fase de pupa y da comienzo su fase de maduración sexual, de una duración aproximada de 8 horas, tiempo en el que podemos encontrar estadios no gestacionales en las moscas hembras que son de especial utilidad en experimentación. Finalmente, las moscas adultas poseen una longevidad muy variable, siendo ésta de aproximadamente 100 días, dependiendo de las condiciones del medio y el acceso a alimento.

#### 3.2.2 Genética de *Drosophila melanogaster*.

Se trata de un organismo diploide conformado por 3 pares de cromosomas autosómicos (2,3,4) y un par de cromosomas sexuales (1). En el caso del cuarto cromosoma, este es considerado vestigial dada su escasez en genes de interés. Se ha extendido por convenio el uso de la siguiente nomenclatura:

$$\frac{1}{1}; \frac{2}{2}; \frac{3}{3}; \frac{4}{4}$$

Figura 8. Explicación del sistema de representación genética en mosca. El punto y coma (;) separa los cromosomas entre sí y la línea horizontal (-) separa ambos alelos.

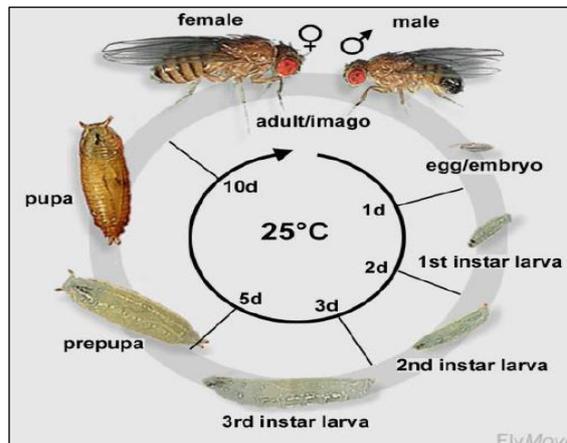


Figura 7. Representación del ciclo vital completo de *Drosophila melanogaster*. Tiempos de duración de cada fase aproximados.

El patrón de herencia en *Drosophila* se rige por las leyes de Mendel (Genética Mendeliana). Según la ley de segregación, una copia de cada gen es heredada de cada progenitor, separando ambas copias durante la meiosis y transmitiéndose únicamente una de ellas a la descendencia. Por otra parte, la ley de transmisión independiente de caracteres se aplica al determinar que la transmisión de cromosomas no-homólogos se produce de manera independiente. Es por ello que se establece un criterio de selección para cada cromosoma. Otro factor de segregación genética que puede ocurrir es el fenómeno de *crossing-over* que ocurre en cromosomas homólogos dando un mayor número de recombinaciones posibles, aunque también varía en función de la posición en que se encuentren en el cromosoma. Esta última manifestación ocurre únicamente en moscas hembra, pudiendo ser un obstáculo solventable a la hora de diseñar cruces.

### 3. 2.3. Patrones fenotípicos clásicos

El uso extendido de esta especie como modelo experimental ha permitido crear grandes bases de datos basadas en sus características anatómicas. De esta manera, podemos dividir la identificación genética en dos procesos:

Por un lado, se ha de identificar el sexo. En general, los machos de *Drosophila* son de menor tamaño que las hembras, poseen una agrupación característica de terminaciones capilares con glándulas secretoras de hormonas de atracción sexual en las patas delanteras y el disco anal posee un aro oscuro alrededor. En el caso de las hembras, éstas suelen ser de mayor tamaño y el abdomen dorsal es más claro y a rayas<sup>9</sup>. Por otro lado, es fundamental determinar en qué fase del desarrollo sexual se encuentra la mosca. En este caso, las moscas vírgenes (obtenidas en un máximo de 8 horas tras su eclosión) poseen una mancha oscura en la zona ventral del abdomen que corresponde al meconio, suelen tener las alas plegadas (todavía sin desarrollar en su totalidad y son de un color más claro que las moscas adultas<sup>9,43</sup>.

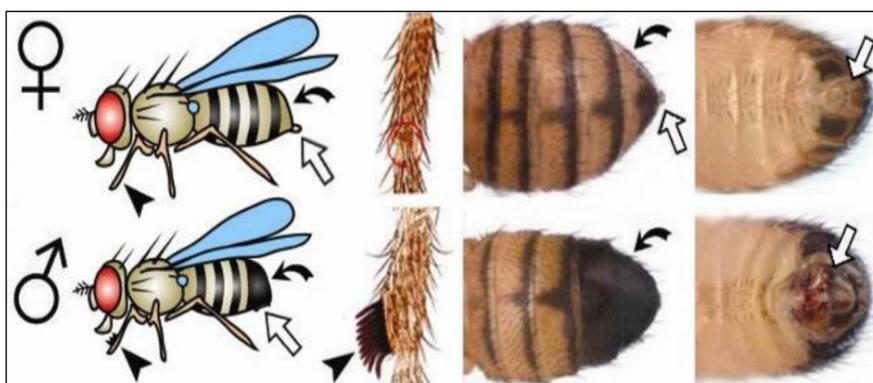
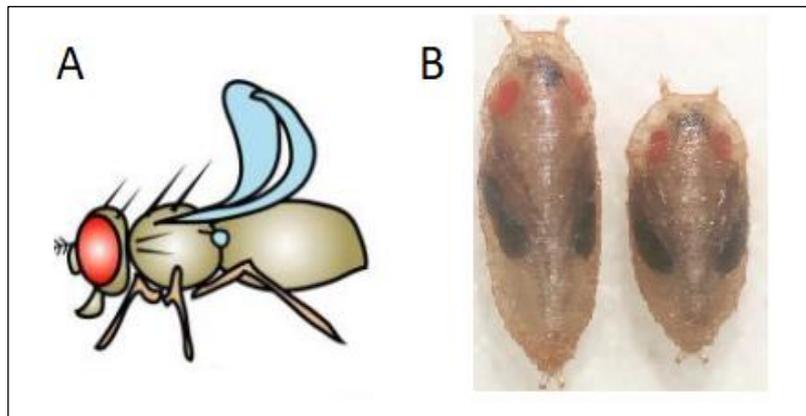


Figura 9. Ejemplo gráfico de los patrones fenotípicos en mosca. Se diferencian los patrones fenotípicos distintivos entre hembras y machos

Los patrones fenotípicos autosómicos nos permiten seleccionar moscas con marcadores genéticos específicos (figura 10). En este experimento, se utilizaron los siguientes marcadores *Cyo* (*Curly*), equivalente a la aparición de alas curvas, y *Tb*, equivalente a la aparición de pupas más redondeadas (*Tubby*).



**Figura 10. Representación de los fenotipos utilizados en el estudio. A)** Representación del fenotipo *Curly* (*Cyo*) en mosca adulta. **B)** Diferencias entre una pupa wildtype (izquierda) y una pupa con portadora del marcador *Tubby* (*Tb*).

#### 3.2. 4. Técnica de silenciamiento en mosca

La obtención de modelos con un silenciamiento efectivo requiere que el procedimiento pueda asegurar en lo mejor posible la transmisión hereditaria correcta de los genes de interés. Con este fin, se eligió el sistema GAL4/UAS, una de las herramientas más útiles en manipulación genética en *Drosophila*, ya que GAL4 no existe de forma endógena en las moscas y no actúa en ningún otro loci de su genoma. Este sistema consta de dos elementos; por una parte, moscas con las secuencias genéticas GAL4, que actúa de gen reportero facilitando que la transmisión genética se dé específicamente en los tejidos de estudio; y por otra, moscas portadoras de secuencias UAS anexadas a los genes de interés, actuando de secuencias potenciadoras de la transmisión, también llamadas *enhancer*<sup>9</sup>.

En nuestro estudio, las líneas con secuencias tipo GAL4 portaban secuencias reporteras REPO (cromosoma 3) específicas de glía, obtenidas del genotipo 7415 de Bloomington stock center<sup>13</sup>, acompañadas de secuencias potenciadoras tipo Dicer (Cromosoma 2). Para facilitar la herencia adecuada de estos genes y evitar errores por segregación cromosómica, estas secuencias iban acompañadas de cromosomas balanceadores, modificaciones que impiden la recombinación génica, siendo letales en homocigosis y asegurando la supervivencia de aquellas moscas con los genes de interés en al menos uno de los alelos del cromosoma.

Para nuestro estudio se seleccionaron moscas del genotipo 9356, portadoras de los siguientes *balancers*:

1. *Cyo*: *Curly derivative of Oster*. Se halla en el cromosoma 2 asociado al marcador fenotípico *Curly* (Cy).
2. *TM6B*: *3rd multiply-inverted 6B*. Se halla en el cromosoma 3 asociado al marcador fenotípico *Tubby* (Tb).

Las moscas transgénicas portadoras de los genes con silenciamiento fueron obtenidas de centros públicos como *Bloomington Drosophila Stock Center (Indiana, EEUU)*<sup>13</sup>, *Stock Center* de Viena (Viena, Austria). Cada uno de estos modelos portaba un elemento transgénico que expresaba un RNA interferente (RNAi), encargado del silenciamiento en los genes de estudio, y secuencias UAS para potenciar dicho efecto. Estos RNAi actúan degradando el RNAm de los genes a silenciar<sup>44</sup>. En este experimento, se utilizaron 4 genotipos de estudio, uno correspondiente a *Caz* (Ortólogo de FUS humano) y tres genotipos para silenciar *Tbph* (Ortólogo de TARBP humano, gen que codifica TDP-43), además de un genotipo *wild-type* como control. Los genotipos fueron los siguientes:

3. 5905: Genotipo *wild-type*,  $\frac{W1118}{W1118}; \frac{+}{+}; \frac{+}{+}$ .
4. 100291: Genotipo silenciamiento *Caz*,  $\frac{W1118}{W1118}; \frac{UAS-Caz\ iRNA}{UAS-Caz\ iRNA}; \frac{+}{+}$ .
5. 39014: Genotipo silenciamiento *Tbph*,  $\frac{W1118}{W1118}; \frac{UAS-TBPHB\ iRNA}{Cyo}; \frac{+}{+}$ .
6. 104401: Genotipo silenciamiento *Tbph*,  $\frac{W1118}{W1118}; \frac{UAS-TBPH401\ iRNA}{UAS-TBPH401\ iRNA}; \frac{+}{+}$ .
7. 38379: Genotipo *Tbph*,  $\frac{W1118}{W1118}; \frac{UAS-TBPH9\ iRNA}{UAS-TBPH9\ iRNA}; \frac{+}{+}$ .

Los modelos 38379 y 104401 comparten el mismo locus, la diferencia radica en el plásmido utilizado para el silenciamiento y con ello una eficiencia distinta. El modelo 39014, también de *Tbph*, está situado en un locus diferente.

### 3.2.5. Diseño de los cruces.

Para generar los cruces correctamente, se utiliza una proporción mayor de hembras vírgenes que de machos, aproximadamente 3:1, dependiendo de la disponibilidad. En nuestro estudio se utilizaron moscas machos del genotipo Dcr/REPO y hembras del genotipo de interés, obteniéndolas en base a sus características fenotípicas y conservándolas en un mismo tubo con el fin de obtener nuevas generaciones con el genotipo adecuado. Una vez se visualizaban las larvas, las moscas progenitoras se transvasaban a un nuevo tubo donde repetirían ciclo, con un máximo de 4 ciclos por cruce. Finalmente, tras el nacimiento de la primera mosca de cada tubo, este se conservaba 9 días y tras ello se desechaba, evitando así cruces posteriores entre las moscas de las nuevas generaciones que podrían causar alteraciones en el genotipo.

El proceso de selección de las moscas experimentales comenzaba obteniendo de cada cruce las pupas que no presentaban el fenotipo *Tubby* (Tb), trasvasándolas conjuntamente a un nuevo tubo. En una segunda fase de selección, de las moscas nacidas de pupas no Tb se obtenían aquellas moscas hembras que no presentasen el fenotipo *Curly* (Cyo) y que no estuviesen fecundadas. Parte de las moscas obtenidas tras esta fase se consideraron moscas experimentales, conservándolas en diferentes tubos formando grupos de 5 por cada genotipo para realizar los test *in vivo*. El resto de mosca con el genotipo adecuado, se utilizaron para realizar las pruebas moleculares.

### **3.3. ENSAYO DE LONGEVIDAD**

Este ensayo se basa en comparar la longevidad de los diferentes genotipos en base al control *wild-type*, utilizando un análisis tipo Mantel-Cox mediante el programa Graph Pad Prism 8.

Se realizó obteniendo 90 hembras experimentales de cada genotipo, 50 para el ensayo sin tratamiento y 40 para el ensayo con tratamiento (inhibidor de FoxO 30 *microM*), obteniendo un total de 450 moscas divididas en 90 tubos. Se revisó cada 2-3 días el número de muertes y se realizó semanalmente un cambio de tubo para evitar cualquier riesgo de contaminación.

### **3.4. ENSAYO LOCOMOTOR**

Se trata de un ensayo de escalada para comparar las variaciones de la capacidad motora de cada genotipo a lo largo de un tiempo determinado. En este caso, se utilizaron las mismas moscas del ensayo de longevidad, realizando el test cada 10 días hasta un máximo de 30 días.

Para la realización de la prueba, el grupo de moscas de cada tubo era transferido a un tubo especial de mayor altura con dos marcas; una a 4cm de la base para garantizar una línea de *salida*; otra marca a 8 cm de la base que debía ser cruzada. Tras un periodo de aclimatación, se estimulaba a las moscas golpeando el tubo, situándolas así a todas en el fondo del mismo y después de un periodo de 10 segundos, se anotaba el total de las moscas que superaban la marca de 8cm, repitiendo el proceso un total de 3 veces por tubo con un periodo de descanso cercano a 1 minuto entre cada prueba. El porcentaje de moscas capaces de atravesar la marca se representó frente a la edad de las mismas. Los resultados se registraban mediante sistemas de grabación. El análisis de los resultados se obtuvo mediante análisis t-student (sin tratamiento) y Anova 2-way (con tratamiento) en la aplicación Graph Pad Prism 8.

### 3.5. BIOLOGÍA MOLECULAR

#### 3.5.1. Extracción proteica

Para este proceso se utilizaron las moscas con el genotipo adecuado que no fueron incluidas para los ensayos de longevidad y locomotor. Las moscas se anestesiaron y mediante el uso de pinzas se separó la cabeza del resto del cuerpo en cada una de ellas, conservando las cabezas en eppendorf formando grupos de 10 muestras y manteniéndolos a -20°C.

Posteriormente, se descongelaron las muestras y se añadió 100 *micro*L de buffer lisis (buffer de lisis con inhibidores de fosfatasa y proteasas (Halt Protease & Phosphatase inhibitor SingleUse Cocktail 100x-Thermo Scientific)). y se realizó una disgregación mecánica mediante el Pellet Pestle Motor (Kontes). Tras la disgregación, se centrifugaron las muestras a 4°C y se obtuvo el sobrenadante.

#### 3.5.2 Western Blot

El objetivo de este test era confirmar que los genotipos obtenidos para las pruebas *in vivo* portaban el silenciamiento adecuadamente. A partir del sobrenadante previamente obtenido, se cuantificó el contenido total de proteína de cada muestra mediante el uso de Nano-drop (Fisher-Scientific). Se tomó 300 *micro*g como cantidad de proteínas totales, se procedió a añadir a cada muestra LB 5X (realizado en el laboratorio, para 50 mL: 5mL Tris-Cl, 12mL glicerol, 4g SDS, 1,55g DTT, 10mg Coomassie Blue R250, H<sub>2</sub>O hasta 50mL) reducido a 4x y se enrasó con buffer lisis con proteasas (proteasas (Halt Protease & Phosphatase inhibitor SingleUse Cocktail 100x-Thermo Scientific) para igualar volúmenes.

La electroforesis se llevó a cabo mediante el uso de geles de tricina de stacking 4% (13% acrilamida, 25% gelbuffert y 62% agua) y 10% (30% acrilamida, 30% gelbuffert, 18% glicerol y 22% agua) preparados al momento. Se introdujeron los geles en las cubetas de electroforesis con anodo buffer 1X en el exterior y catode buffer 1X en el interior, inicialmente a 50 mV durante 10 minutos, seguido de 1 hora y 30 minutos a 120 mV. La transferencia se realizó en membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) sumergidas en transfer buffer 1X, dejándolo *overnight* a 20mV en cámara a 4°C. Se realizó control de carga con el kit total protein staining (Thermo-Fisher Scientific). Se bloqueó la membrana con BSA 5% durante 45 minutos previo a su incubación con anticuerpo primario *TBPH*-Rabbit a concentración 1:250 (diluido en BSA 5%) durante 3 días a 4°C. Tras ello, se utilizó un anticuerpo secundario fluorescente *Alpha*-rabbit 647nm en concentración 1:500. El revelado se realizó en el dispositivo IBright FL 1000 y el resultado de fluorescencia de las bandas específicas de cada anticuerpo se normalizó con la señal obtenida en la cuantificación de la carga.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. OBTENCIÓN DE LOS MODELOS CON SILENCIAMIENTO DE *Tbph* Y *Caz* EN GLÍA

El objetivo de los cruces fue generar modelos de mosca con silenciamiento condicional en células de la glía. Siguiendo los principios de la genética mendeliana, el sistema de expresión génica UAS-GAL4 y utilizando la presencia/ausencia de marcadores fenotípicos de interés para la selección genotípica, pudimos generar nuevas líneas experimentales que fueran portadoras de las secuencias *enhacer* UAS y los RNAi de silenciamiento sin la realización de continuas pruebas de genotipado. La utilización del promotor REPO, gen exclusivamente expresado en poblaciones celulares gliales, permitió asegurar que dicho silenciamiento génico se realizaría exclusivamente en la población celular diana del presente proyecto.

#### 4.1.1. Generación del modelo REPO/Dcr-2

Para obtener moscas con silenciamiento específico y exclusivo en células de la glía de los genes *Tbph*, o *Caz*, ortólogos de los genes humanos TARBP y FUS respectivamente, fue necesario realizar cruces previos. El objetivo inicial de estos cruces fue obtener moscas que expresen GAL4 en células positivas para el gen reportero de glía (REPO), acompañado de secuencias *enhacer* Dcr-2, utilizadas para potenciar la eficacia del silenciamiento deseado, y los *balancers* TM6 *tb* y *Cyo*, dando como resultado modelos de mosca con el genotipo de interés ( $\frac{+}{+}; \frac{DCR2}{Cyo}; \frac{Repo}{TM6B}$ ). La selección de moscas portadoras de los marcadores seleccionados en cada cruce se realiza en previsión de que, tras el cruce final para obtener el modelo deseado, la generación F1 no tenga ningún balancer ni marcador, para asegurar la idoneidad del mismo para su caracterización.

Para lograrlo, se han de generar primero dos *stocks* de moscas; por un lado, moscas portadoras de *enhacer* Dcr-2; por otro, moscas portadoras del reportero REPO.

#### Líneas portadoras de REPO

En el primer cruce, se utilizaron moscas portadoras del genotipo REPO con moscas portadoras de 4 marcadores fenotípicos (dos de ellos con balancers) Una vez en periodo larvario tardío, se seleccionaron aquellas que fueran del fenotipo *Tubby* (Tb). Tras la eclosión, se seleccionaban las que portaban el marcador fenotípico *Curly* (Cyo), desechando el resto. De esta manera, se obtenían moscas portadoras del reportero de glía y de cromosomas balanceadores, evitando la recombinación tanto del 2 como del 3 cromosoma y asegurando la transmisión de los genes de interés en próximas generaciones, además de reducir el número posible de genotipos viables dada su letalidad en homocigosis.

|            |   |   |   |                        |
|------------|---|---|---|------------------------|
| <b>P)</b>  | ♀ $\frac{W118}{W118}; \frac{+}{+}; \frac{REPO}{TM3sb}$  | x | ♂ $\frac{W118}{W118}; \frac{Wgsp}{Cyo}; \frac{Ki}{TM6B Tb}$ |                        |
| <b>F1)</b> | $\frac{W118}{W118}; \frac{Wgsp}{+}; \frac{REPO}{Ki}$    |   | $\frac{W118}{W118}; \frac{+}{Cyo}; \frac{REPO}{Ki}$         |                        |
|            | $\frac{W118}{W118}; \frac{Wgsp}{+}; \frac{Ki}{TM3sb}$   |   | $\frac{W118}{W118}; \frac{+}{Cyo}; \frac{Ki}{TM3sb}$        |                        |
|            | $\frac{W118}{W118}; \frac{Wgsp}{+}; \frac{REPO}{TM3sb}$ |   | $\frac{W118}{W118}; \frac{+}{Cyo}; \frac{REPO}{TM6B Tb}$    | Selección<br>Cyo y Tb. |

Figura 11. Generación moscas REPO con los marcadores Cyo y Tb.

A partir de las moscas seleccionadas en la generación F1 se realizó un segundo cruce, de nuevo con el genotipo 9356. Se volvieron a seleccionar pupas tb y en esta ocasión, de las moscas nacidas se seleccionaron hembras y machos con los marcadores Cyo y Wgsp, desechando el resto.

|            |  |   |   |                                 |
|------------|--|---|---|---------------------------------|
| <b>F1)</b> | ♀ $\frac{W118}{W118}; \frac{+}{Cyo}; \frac{REPO}{TM6B Tb}$   | x | ♂ $\frac{W118}{W118}; \frac{Wgsp}{Cyo}; \frac{Ki}{TM6B Tb}$ |                                 |
| <b>F2)</b> | $\frac{W118}{W118}; \frac{+}{Wgsp}; \frac{REPO}{Ki}$         |   | $\frac{W118}{W118}; \frac{+}{Cyo}; \frac{REPO}{Ki}$         |                                 |
|            | $\frac{W118}{W118}; \frac{+}{Wgsp}; \frac{REPO}{TM6B Tb}$    |   | $\frac{W118}{W118}; \frac{+}{Cyo}; \frac{REPO}{TM6B Tb}$    |                                 |
|            | $\frac{W118}{W118}; \frac{+}{Wgsp}; \frac{Ki}{TM6 Tb}$       |   | $\frac{W118}{W118}; \frac{+}{Cyo}; \frac{Ki}{TM6B Tb}$      |                                 |
|            | $\frac{W118}{W118}; \frac{Wgsp}{Cyo}; \frac{REPO}{Ki}$       |   | $\frac{W118}{W118}; \frac{Wgsp}{Cyo}; \frac{REPO}{TM6B Tb}$ | Selección<br>Cyo, Tb y<br>Wgsp. |
|            | $\frac{W118}{W118}; \frac{Wgsp}{Cyo}; \frac{REPOKi}{TM6 Tb}$ |   |   |                                 |

Figura 12. Generación de moscas REPO con los marcadores Wgsp, Cyo y Tb

De esta manera, se obtuvo el genotipo REPO en el cromosoma 3, junto con cromosomas balanceadores letales en homocigosis asegurando la transmisión de al menos un alelo REPO a las siguientes generaciones. Además, el gen REPO no es letal en homocigosis, lo que es una gran ventaja, ya que en generaciones siguientes el *balancer* TM6B (Tb) puede ir desapareciendo obteniéndose un genotipo de REPO en homocigosis.

### Líneas portadoras de Dcr-2

De manera paralela a los cruces anteriores, se realizaron cruces de hembras con el genotipo para DCR-2 en el cromosoma 2 (24650) con machos que expresaban los 4 marcadores (Genotipo 9356). Se seleccionaron las moscas Tb y Cyo.

|            |   |   |   |                        |
|------------|---|---|---|------------------------|
| <b>P)</b>  | ♀ $\frac{W118}{W118}; \frac{DCR2}{DCR2}; \frac{+}{+}$     | X | ♂ $\frac{W118}{W118}; \frac{Wgsp}{Cyo}; \frac{Ki}{TM6B Tb}$ |                        |
| <b>F1)</b> | $\frac{W118}{W118}; \frac{DCR2}{Wgsp}; \frac{+}{Ki}$      |   | $\frac{W118}{W118}; \frac{DCR2}{Cyo}; \frac{+}{Ki}$         |                        |
|            | $\frac{W118}{W118}; \frac{DCR2}{Wgsp}; \frac{+}{TM6B Tb}$ |   | $\frac{W118}{W118}; \frac{DCR2}{Cyo}; \frac{+}{TM6B Tb}$    | Selección<br>Cyo y Tb. |

Figura 13. Generación de moscas DCR-2 con los marcadores Cyo y Tb.

El segundo cruzó se realizó, de nuevo, utilizando el genotipo 9356 con las moscas obtenidas en F1. Se seleccionaron moscas que cumplían el fenotipo Ki, Tb, Cyo, descartando las que expresaban Wgsp y TM3sb.

|            |  |   |   |                               |
|------------|--|---|---|-------------------------------|
| <b>F1)</b> | ♀ $\frac{W118}{W118}; \frac{DCR2}{Cyo}; \frac{+}{TM6B Tb}$ | X | ♂ $\frac{W118}{W118}; \frac{Wgsp}{Cyo}; \frac{Ki}{TM6B Tb}$ |                               |
| <b>F2)</b> | $\frac{W118}{W118}; \frac{DCR2}{Wgsp}; \frac{+}{Ki}$       |   | $\frac{W118}{W118}; \frac{DCR2}{Cyo}; \frac{+}{Ki}$         |                               |
|            | $\frac{W118}{W118}; \frac{DCR2}{Wgsp}; \frac{+}{TM6B Tb}$  |   | $\frac{W118}{W118}; \frac{DCR2}{Cyo}; \frac{+}{TM6B Tb}$    |                               |
|            | $\frac{W118}{W118}; \frac{DCR2}{Wgsp}; \frac{Ki}{TM6B Tb}$ |   | $\frac{W118}{W118}; \frac{DCR2}{Cyo}; \frac{Ki}{TM6B Tb}$   | Selección<br>Cyo, Tb y<br>Ki. |
|            | $\frac{W118}{W118}; \frac{Wgsp}{Cyo}; \frac{+}{Ki}$        |   | $\frac{W118}{W118}; \frac{Wgsp}{Cyo}; \frac{+}{TM6B Tb}$    |                               |
|            | $\frac{W118}{W118}; \frac{Wgsp}{Cyo}; \frac{Ki}{TM6B Tb}$  |   |   |                               |

Figura 14. Generación de moscas DCR-2 con los marcadores Cyo, Tb y Ki.

Finalmente, el último cruce tenía como objetivo la obtención de moscas (F3) con el modelo de interés para la hipótesis del proyecto. Este consistió en cruzar las moscas F2 portadoras de REPO con las moscas F2 portadoras de DCR-2, descartando los genotipos *Wgsp* y *Ki* y generándose así el *stock* necesario para cruzar posteriormente con las moscas portadoras del RNAi de silenciamiento.

|            |  |   |                           |
|------------|--|---|---------------------------|
| <b>F2)</b> | ♀ $\frac{W118}{W118}; \frac{DCR2}{Cy0}; \frac{Ki}{TM6B Tb}$  | ♂ $\frac{W118}{W118}; \frac{Wgsp}{Cy0}; \frac{REPO}{TM6B Tb}$ |                           |
| <b>F3)</b> | $\frac{W118}{W118}; \frac{DCR2}{Wgsp}; \frac{REPO}{Ki}$      | $\frac{W118}{W118}; \frac{DCR2}{Cy0}; \frac{REPO}{Ki}$        |                           |
|            | $\frac{W118}{W118}; \frac{DCR2}{Wgsp}; \frac{REPO}{TM6B Tb}$ | $\frac{W118}{W118}; \frac{DCR2}{Cy0}; \frac{REPO}{TM6B Tb}$   | Selección <i>Cyo, Tb.</i> |
|            | $\frac{W118}{W118}; \frac{DCR2}{Wgsp}; \frac{REPO}{TM6B Tb}$ | $\frac{W118}{W118}; \frac{DCR2}{Cy0}; \frac{Ki}{TM6B Tb}$     |                           |
|            | $\frac{W118}{W118}; \frac{Wgsp}{Cy0}; \frac{REPO}{Ki}$       | $\frac{W118}{W118}; \frac{Wgsp}{Cy0}; \frac{REPO}{TM6B Tb}$   |                           |
|            | $\frac{W118}{W118}; \frac{Wgsp}{Cy0}; \frac{Ki}{TM6B Tb}$    |   |                           |

Figura 15. Generación de moscas DCR-2/REPO con los marcadores *Cyo* y *Tb*.

#### 4.1.2. Generación del modelo con silenciamiento dirigido a glía

Una vez generado un *stock* suficiente de moscas con el genotipo *Dcr-2/REPO*, se inició el proceso de formación de modelos con silenciamiento dirigido a glía, a partir de los 4 modelos de moscas con secuencias RNAi. Estas fueron cruzadas con moscas del *stock* *Dcr-2/REPO* con el fin de obtener moscas portadoras del RNAi, el gen reportero de glía y secuencias *enhacer* UAS. Para ello, se seleccionaron moscas que no presentasen ninguno de los dos marcadores (*Cy*, *Tb*).

|            |   |  |
|------------|---|--|
| <b>P)</b>  | ♂ $\frac{W118}{W118}; \frac{DCR2}{Cy0}; \frac{REPO}{TM6B Tb}$     | ♀ $\frac{W118}{W118}; \frac{UAS-RNAi}{UAS-RNAi}; \frac{+}{+}$  |
| <b>F1)</b> | $\frac{W118}{W118}; \frac{UAS-RNAi}{Cy0}; \frac{+}{TM6B Tb}$      | $\frac{W118}{W118}; \frac{UAS-RNAi}{Cy0}; \frac{REPO}{+}$      |
|            | $\frac{W118}{W118}; \frac{UAS-Dcr2}{UAS-RNAi}; \frac{+}{TM6B Tb}$ | $\frac{W118}{W118}; \frac{UAS-Dcr2}{UAS-RNAi}; \frac{REPO}{+}$ |

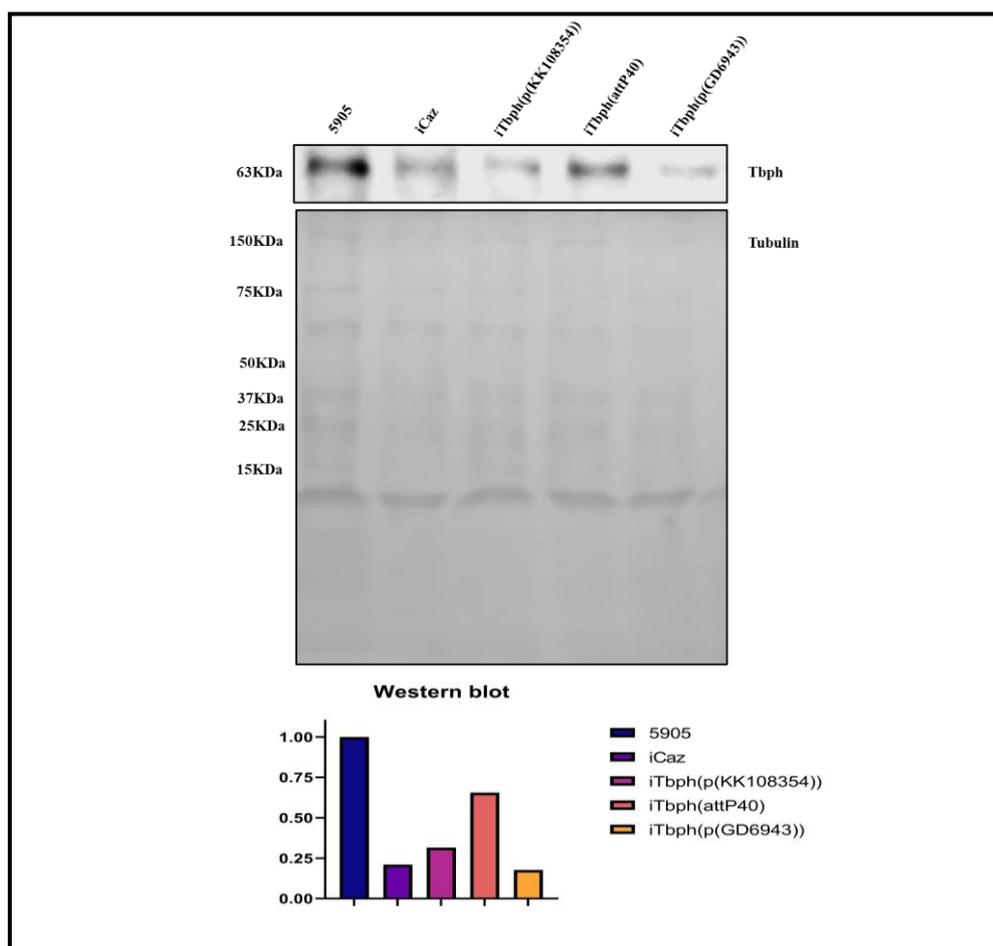
Figura 16. Selección de los modelos DCR2/REPO sin marcadores y portadoras del RNAi de interés.

Así, se generaron líneas de moscas con silenciamiento dirigido a glía. Los genotipos finales obtenidos por cada gen de interés fueron los siguientes:

|  |  |
|--|--|
| a) $\frac{W118}{W118}; \frac{UAS-Dcr2}{UAS-TBPH9}; \frac{REPO}{+}$   | d) $\frac{W118}{W118}; \frac{UAS-Dcr2}{UAS-CAZ}; \frac{REPO}{+}$ |
| b) $\frac{W118}{W118}; \frac{UAS-Dcr2}{UAS-TBPH401}; \frac{REPO}{+}$ | e) $\frac{W118}{W118}; \frac{UAS-Dcr2}{+}; \frac{REPO}{+}$       |
| c) $\frac{W118}{W118}; \frac{UAS-Dcr2}{UAS-TBPHloo}; \frac{REPO}{+}$ |  |

**Figura 17. Modelos finales obtenidos utilizados para experimentación.** a) Modelo para el iTbph(P(GD6943)). b) Modelo para iTbph(p(KK108354)). c) Modelo para iTbph(attP40). d) Modelo para iCaz. e) Modelo control wild-type.

#### 4.2. ENSAYO DE CONFIRMACIÓN MOLECULAR DEL SILENCIAMIENTO



**Figura 18 Comprobación molecular del silenciamiento de Tbph y Caz en células de la glía.** Expresión de Tbph en el control y en los genotipos a estudio. Resultados normalizados respecto al control y representados gráficamente. Muestra obtenida a partir de *pools* de 20 cabezas por genotipo (n=1).

Para certificar el silenciamiento de *Tbph*, se obtuvieron anticuerpos generados y validados “*in house*” en colaboración con el Dr. Raimundo Freire del Hospital Universitario de Canarias. Se analizaron secuencias específicas de cada genotipo: Control, iCaz (secuencia UAS-Caz, cromosoma 2), iTbph(p(KK108354)) (secuencia UAS-Tbph401, cromosoma 2), iTbph(attP40) (secuencia UAS-TbphBloo, cromosoma 2) e iTbph(p(GD6943)) (secuencia UAS-TBPH9, cromosoma 2). Según el protocolo establecido en el laboratorio, se partió de un pull de 20 cabezas de cada genotipo a estudio (n=1). Los resultados obtenidos confirman un silenciamiento eficaz en los modelos presentando en comparación con el control. Estos resultados no obtuvieron significancia estadística dado el tamaño muestral utilizado (n=1), a pesar de que puede deducirse como fiable ya que cada muestra estaba conformada por un pull de 20 cabezas. Actualmente, se está trabajando en el laboratorio para poder ampliar el tamaño muestral al realizar estos ensayos.

### **4.3 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICO-FUNCIONAL DEL SILENCIAMIENTO DE *Tbph* Y *Caz* EN CELULAS DE LA GLIA**

#### **4.3.1. Ensayo locomotor**

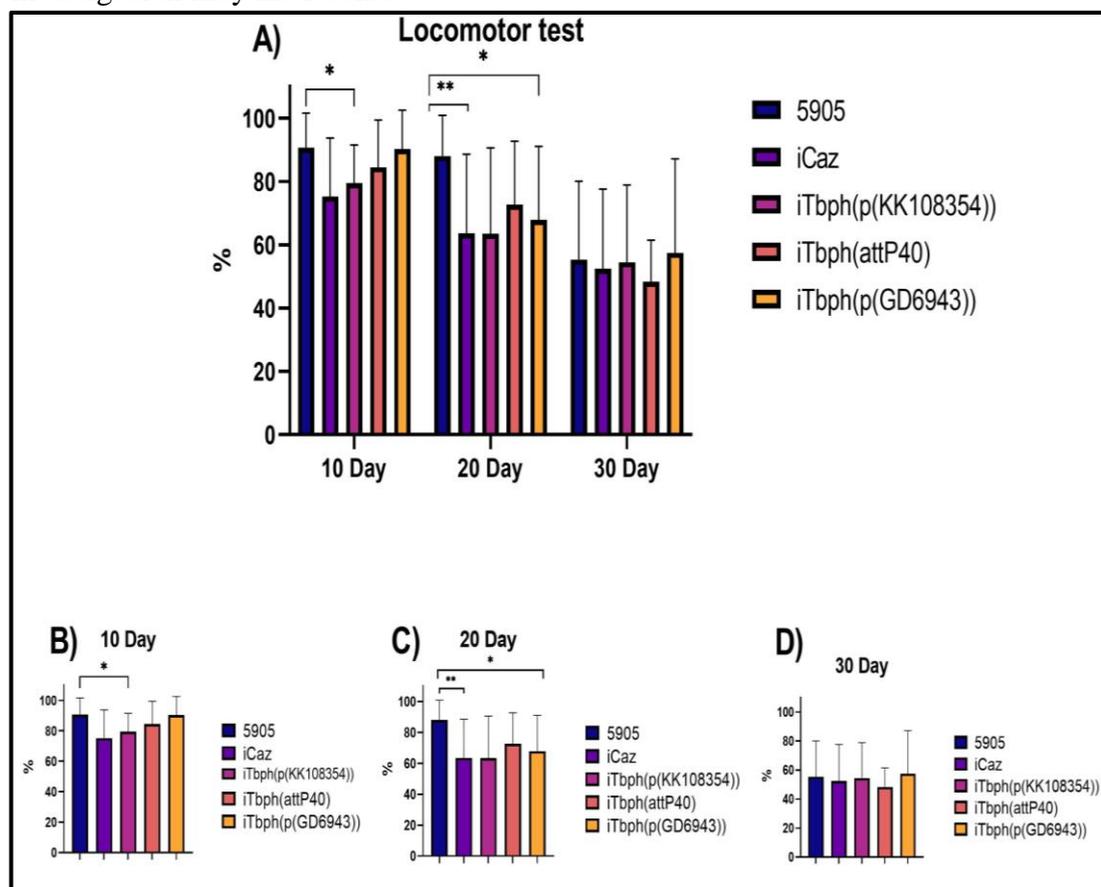
El estudio evaluó la capacidad motora de cada modelo de silenciamiento a diferentes edades con diferentes estrategias de silenciamiento, para posteriormente seleccionar aquel/aquellos modelos que mejor remedan algunas de las características de la enfermedad en seres humanos y, por lo tanto, sean válidos para el testeo de innovadoras estrategias terapéuticas.

El modelo de iTbph(p(GD6943)) demostró una disminución significativa con respecto al control, especialmente en el día 20 (\*p<0,05, n=50). Debido a la baja eficiencia del modelo en comparación con el resto, este no fue seleccionado para el test con inhibidor de FoxO. En el caso de iTbph(p(KK108354)) (secuencia UAS-Tbph401), los resultados obtenidos a 10 y 20 días demuestran una disminución significativa en comparación al control (\*p<0,05, n=50), demostrando que el silenciamiento provoca un efecto desde edades tempranas. El modelo comparte locus con el genotipo anterior, iTbph(p(KK108354)), lo que, valorando los resultados del 20º día, demuestra la eficacia del locus como objetivo. Además, este modelo está generado con un plásmido de mayor eficiencia, lo que concuerda con los resultados obtenidos. Los datos obtenidos con este modelo fueron estadísticamente muy robustos por lo que fue seleccionado para el testeo farmacológico y por lo tanto para el tratamiento con inhibidor de FoxO.

Por otro lado, los resultados medidos para el genotipo iTbph(attP40) (secuencia UAS-TbphBloo), de otro locus distinto a los anteriores, adquieren significancia (\*p<0,05, n=50) sólo en el día 20 y de nuevo. Este hecho podría indicar que la diferencia de localización cromosómica parece inducir un inicio más precoz de la enfermedad. Este

modelo fue seleccionado para el testeo farmacológico y por lo tanto para el tratamiento con inhibidor de FoxO. Finalmente, en los resultados para el genotipo *iCaz* (secuencia UAS-*Caz*), podemos ver que para los días 10 y 20° las diferencias con el control resultan significativas, especialmente al día 20 (\*\* $p < 0,01$ ,  $n=50$ ). Este modelo fue seleccionado para el test con inhibidor de FoxO, ya que *Caz*, siendo ortólogo de FUS humano, resulta de especial interés para el estudio de la enfermedad.

De manera resumida, la eficacia del silenciamiento en *Caz* y *Tbph* ha quedado demostrada al obtenerse resultados significativos en la disminución de la movilidad de las moscas, obteniéndose resultados más significativos al 20° día. Con estos resultados, se seleccionaron los modelos para los test con tratamiento. En el caso de los modelos *Tbph*, al tener modelos para distintos locus seleccionamos aquellos con resultados más eficaces, como son los modelos para *iTbphBloo* e *iTbph401*. En el caso de las moscas *Caz*, la gran eficacia del silenciamiento al 20° día hace de este modelo una línea de investigación muy interesante.



**Figura 19 El silenciamiento en células de la glía de *Tbph* y *Caz* produce un deterioro motor significativo y diferente según el locus en el que se aplique dicho silenciamiento.** Representación del porcentaje de moscas respecto a sus días de vida que superaron el test locomotor. Valores expresados en media más desviación estándar. T-student \* $< 0,05$ , \*\* $< 0,01$  ( $n=50$ ). **A)** Resultado global de la actividad locomotora. **B)** Resultado medidos a 10 días. **C)** Resultados medidos a 20 días, **D)** Resultados obtenidos a 30 días.

### 4.3.2. Ensayo de longevidad

Con este test se estudia el tiempo de supervivencia de cada genotipo en relación con el control. Este test se realizó con las mismas moscas que los experimentos de capacidad locomotora.

Como podemos comprobar, los modelos *iCaz* y *iTbph(p(KK108354))*, vivieron más en comparación con el control. En cambio, tanto el modelo *iTbph(attP40)* como el modelo *iTbph(p(GD6943))* aportaron datos estadísticamente significativos ( $*p < 0,05$ ) para una reducción de supervivencia en comparación con el control. La reducción de la longevidad en los modelos *iTbph(attP40)* e *iTbph(p(GD6943))* favorece la elección de los modelos *tbph* para su utilidad como métodos de screening farmacológico, como se realizó en este TFG. En el caso del modelo *Caz*, los resultados obtenidos en los test locomotores resultaron suficientes para su elección en los test de screening, a pesar de los resultados de longevidad.

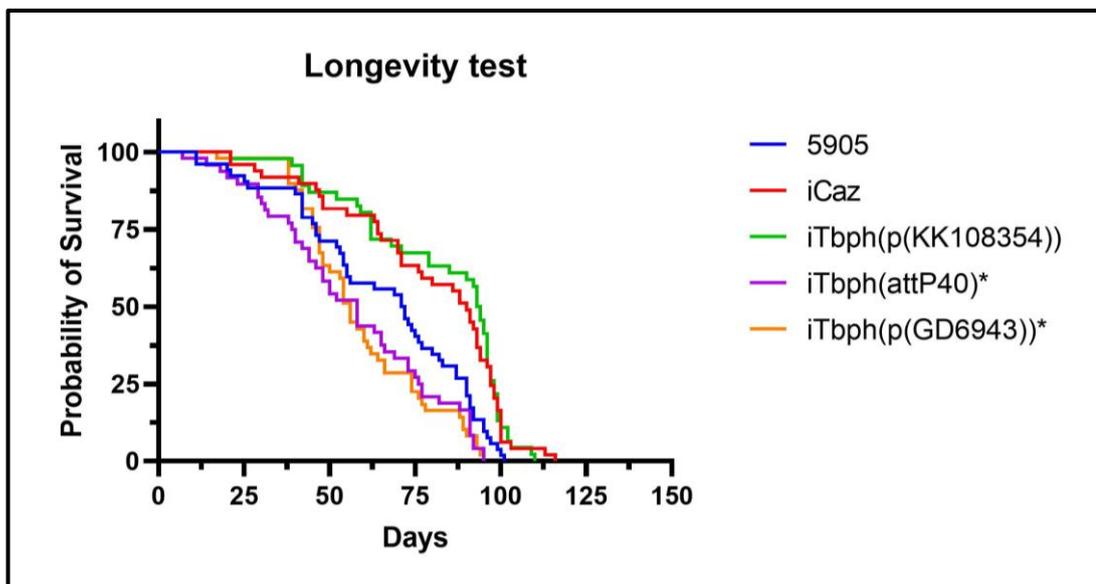


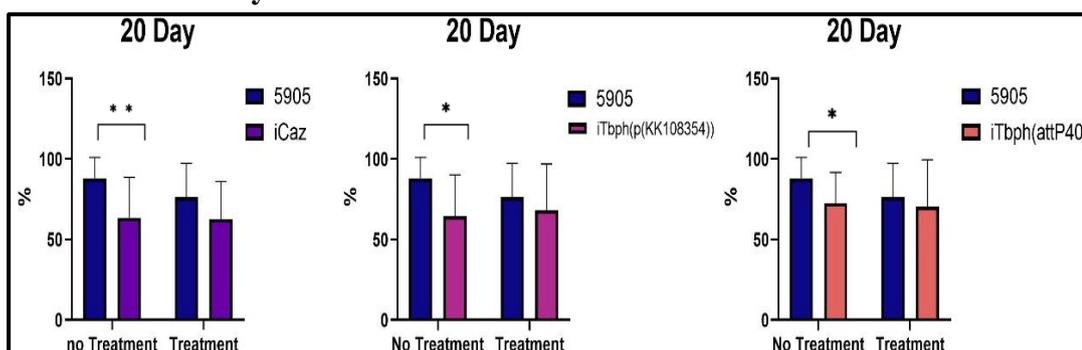
Figura 20 Demostración del efecto del silenciamiento en la longevidad. Representación del porcentaje de moscas vivas por día. El ensayo acabó cuando murieron todos los ejemplares. Resultados medidos con Mantel-Cox test  $*p < 0,05$  (n=50).

#### 4.4. ENSAYO EN TRATAMIENTO CON INHIBIDOR DE FOXO.

La relación entre el gen TDP-43 y los factores de transcripción FoxO ha sido ampliamente estudiada. Se trata de una familia transcritores bajo las siglas FoxO (*Forkhead box protein O*) que juegan un papel primordial en periodos de alta demanda energética al regular la expresión de genes del metabolismo de glucosa y lípidos, suscitando una posible acción de estos transcritos como mediadores del efecto tóxico generado por la disfunción en TDP-43<sup>35,39</sup>. Bajo esta premisa, estudios previos del laboratorio donde se ha realizado este TFG obtuvieron resultados preliminares que demuestran que la inhibición de FoxO-01 en mioblastos durante la diferenciación muscular (periodo de alta demanda energética) produce una mejora en los parámetros fenotípicos-funcionales, lo que condujo a generar la patente para el desarrollo de un fármaco con FoxO como diana terapéutica para el tratamiento de la ELA (FOXOAS1842856, ref.EP20382444). Con estos indicios y la evidencia actual, resulta interesante investigar la opción de aplicar dicho tratamiento en el resto de integrantes de la unión neuromuscular, como es la glía, ya que podría tener efectos positivos teniendo en cuenta que el astrocito no es solo el soporte nutricional y metabólico de la neurona, sino que es, además, el tipo celular del sistema nervioso central más glucolítico.

Estos test se realizaron con los modelos seleccionados a partir de los test sin tratamiento y los análisis moleculares, descartando el modelo para iTbph(p(GD6943)) y continuando con iCaz, iTbph(p(KK108354)) e iTbph(attP40), todos comparados con el mismo control utilizado con anterioridad (5905). Se utilizó un tratamiento basado en el inhibidor de FoxO AS1842856, que se administró a través de la comida en una concentración de 30 $\mu$ M.

##### 4.4.1. Ensayo locomotor.



**Figura 21. Efecto del inhibidor de FoxO como tratamiento para revertir los efectos del silenciamiento.** Representación del porcentaje total de moscas que superaron el test, comparando los resultados con y sin uso del tratamiento. No se obtuvieron resultados significativos (n=40).

En lo que referente a la capacidad locomotora, en los modelos iCaz e iTbph(p(KK108354)) no hallamos diferencias estadísticamente significativas en comparación con el control en ninguna de las 3 fechas. Para poder verificar la validez

de estos datos, se requirió comparar los resultados con los obtenidos en el modelo control para comparar las diferencias de los grupos. Para ello, se eligieron como modelo a comparar los resultados obtenidos el día 20 en el test sin tratamiento.

Con los resultados obtenidos, el tratamiento con inhibidor de FoxO no fue capaz de revertir los déficits funcionales detectados en los modelos debido al silenciamiento de Tbph y Caz.

#### 4.4.2. Ensayo de longevidad.

Hasta la fecha establecida para la entrega del proyecto, los estudios de longevidad con tratamiento no han podido ser finalizados, las moscas viven alrededor de 3 meses por lo que este experimento no ha podido ser completado en el periodo de tiempo establecido para este TFG. Sin embargo, el experimento sigue en marcha en el laboratorio para obtener los resultados pertinentes para el equipo de investigación y sus proyectos. De todas formas, se aportan los datos obtenidos hasta el momento sin obtener resultados significativos para ser valorados.

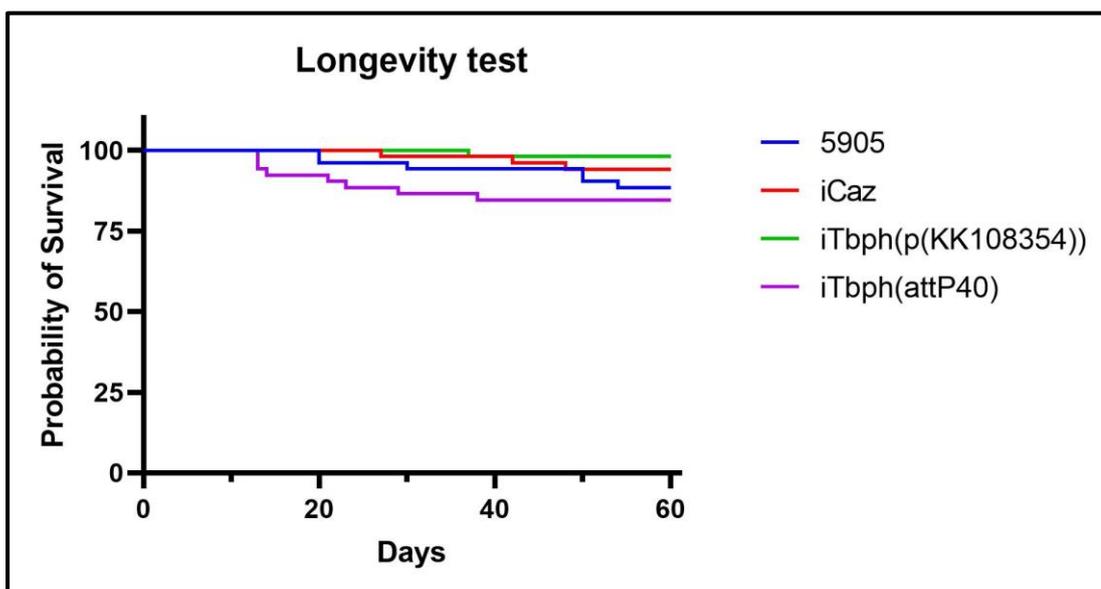


Figura 22. Efecto del inhibidor de FoxO como tratamiento para revertir los efectos del silenciamiento. Representación del porcentaje de moscas vivas por día. Los datos obtenidos hasta la fecha de entrega del trabajo, 60 días desde el inicio del test. (n=40)

## 5. DISCUSIÓN

El presente estudio forma parte de un proyecto más ambicioso llevado por el equipo de enfermedades neurodegenerativas en el Instituto Bionostia, que tiene como objetivo identificar los principales *pathways* moleculares implicados en el origen etiopatogénico de la ELA. En contraposición con la teoría clásica de la ELA, donde la degeneración de la motoneurona tiene su origen en la propia motoneurona, nuevas corrientes de pensamiento indican que el origen de la enfermedad podría estar estrechamente relacionado con los integrantes no neuronales de la Unión neuromuscular (UNM)<sup>45</sup>. Por eso, algunas líneas de investigación se han centrado en intentar identificar las implicaciones de cada tipo celular<sup>29</sup> (motoneurona, glía y tejido muscular) en los demás integrantes de la UNM, siendo el presente trabajo parte de esa caracterización y estudio, en este caso en los modelos *in vivo*. Concretamente, nos hemos centrado en el estudio de la implicación de los astrocitos en la ELA, por lo que el principal objetivo de este trabajo ha sido el de obtener un modelo que rememore algunas de las características más importantes de la enfermedad en humanos, con la intención futura de identificar si un mecanismo patológico de origen astrocitario pudiera contribuir o incluso provocar *persé* la degeneración de la motoneurona, característica de la ELA. A continuación, se ha realizado un tratamiento para actuar sobre una posible diana innovadora de la enfermedad, como es FOXO1, derivada de resultados obtenidos anteriormente en el propio laboratorio donde se ha desarrollado este TFG, concretados en una patente en desarrollo (patente número: EP20382444).

En concreto, se han generado modelos de silenciamiento de los genes *Tbph* y *Caz*, ortólogos de los genes humanos *TARBP* y *FUS*, cuyas mutaciones son causantes de ELA en mosca. Los modelos de *Drosophila* presentan grandes ventajas con respecto a otros modelos animales en cuanto a la facilidad de manejo, reducidos costes y tiempo empleado en generarlos, con lo que la mosca de la fruta se considera una herramienta *in vivo* muy útil para avanzar en el conocimiento de las enfermedades<sup>10,16</sup> y facilitar estudios de testado farmacológico *in vivo*.

El silenciamiento de los genes ortólogos de TDP-43 y FUS (*Tbph* y *Caz* respectivamente), expresados ubicuamente causan letalidad, pero, además, silenciar estos genes específicamente en células de la glía es clave para dilucidar la implicación real de este tipo celular en eventos patológicos asociados y/o causantes de la ELA. La elección de los genes ortólogos de TDP-43 y FUS se basa en la gran implicación de los mismos en los procesos de regulación de la transcripción del DNA y de las vías de obtención energética celular, elementos que, además, se encuentran íntimamente relacionados con el origen patocelular de la ELA<sup>16,18,19</sup>. En el caso de FUS, su relación con la ELA se debe al perfil transcriptómico similar a TDP-43<sup>23</sup>, que hace que mutaciones en FUS afecte directamente al ensamblaje normal de la proteína TDP-43. A nivel metabólico, las mutaciones en TDP-43 generan alteraciones en su localización

citoplasma-núcleo, provocando una pérdida nuclear así como la formación de gránulos de estrés citoplasmáticos tóxicos para la célula<sup>53</sup>. Precisamente, esta localización diferencial patológica hace que los modelos de silenciamiento nuclear utilizados en el presente trabajo recapitulan importantes aspectos de la enfermedad, aunque no todos.

El papel de la UNM en la patogénesis de la enfermedad ha demostrado ser un factor fundamental como objetivo de estudio, ya que los resultados obtenidos en varias líneas de investigación han demostrado su protagonismo fundamental y su implicación a la hora de revertir los efectos de la enfermedad al aplicar nuevas líneas de tratamiento. Dentro de los elementos implicados en la UNM, la degeneración de motoneurona es el factor clave para el desarrollo de la enfermedad, pero se desconoce si su alteración autónoma es suficiente para desarrollar la enfermedad o requiere de la contribución del músculo y/o astrocito y si esta contribución pudiera ser un desencadenante primario de la degeneración de motoneurona<sup>29,30</sup>.

En el Área de Neurociencias de Biodonostia, se han realizado previamente a este trabajo silenciamientos de *Tbph* y *Caz* específicos de los demás integrantes de la UNM, es decir, tanto en motoneurona como en músculo (publicaciones en preparación). Este TFG viene a completar la obtención y caracterización de modelos de silenciamiento tejido-tipo celular específico para determinar la implicación de cada uno de ellos en el origen y desarrollo patogénico de la ELA. Concretamente, con el silenciamiento específico en tejido astrogial. Dentro de los tipos celulares implicados, la glía ha sido el elemento menos estudiado, sobre todo debido a la interpretación básica de su reducida participación en la placa motora como elemento generador de la contractibilidad muscular esquelética, lo que tiende a orientar su implicación como elemento adyuvante de este proceso.

A la hora del estudio del origen patogénico de la ELA, la participación del astrocito ha demostrado ser también un elemento clave, ya que en ratones en los se ha producido una mutación de TDP-43 específicamente en astrocitos, fue suficiente para provocar neurodegeneración de motoneurona<sup>54</sup>. Mientras que esa misma mutación en motoneurona no provocó su degeneración<sup>55</sup>.

En los estudios moleculares, se comprobó la correcta disminución de la expresión de *Tbph* para los diferentes modelos, en especial en los modelos que compartían locus (Los asociados a *Tbph401* y *Tbph9*). Es estos, además, se pudo comprobar la diferente eficacia que existe entre ellos, dado que la obtención del iRNA para *Tbph401* se realiza mediante un plásmido más eficaz. Los resultados obtenidos para *Caz* concuerdan con lo esperado, dado su carácter transcriptómico semejante con *Tbph*. Los resultados para el modelo *TbphB* no son tan satisfactorios como lo esperado, pero reafirman la capacidad de generar un silenciamiento independientemente del locus donde se centre, a pesar de obtenerse una menor eficacia del mismo. Una posible explicación a este

hecho podría ser una sobreexpresión compensatoria en otros subtipos celulares de la muestra analizada, dado que el material estudiado fueron cabezas de moscas enteras y no tejido glial exclusivamente. El resultado de este ensayo favorece la hipótesis de una menor eficacia del silenciamiento en glía en comparación con los otros tipos celulares de la UNM, ya que, tanto en los estudios basados en tejido muscular como en motoneurona, los resultados del silenciamiento eran más marcados que los obtenidos en glía independientemente del gen utilizado. Por otro lado, el resultado para *Caz* en esos tejidos también ha demostrado su capacidad de disminuir la expresión de *Tbph*, ortólogo de TDP-43, lo que reafirma este gen como uno de los objetivos de estudio.

Los ensayos locomotores lograron reproducir los resultados que existen en la literatura al demostrar una significativa disminución de la capacidad motora de las moscas<sup>17,20</sup>, a pesar de que los plásmidos empleados para generar los modelos no sea siempre exactamente el mismo. En este caso, los resultados fueron especialmente significativos a día 20 de estudio, lo que sugiere que el silenciamiento en glía resulta menos eficaz que en el resto de la UNM, donde los resultados obtenidos en otros estudios generan un déficit motor desde el 10° o 15° día de vida en la totalidad de genotipos estudiados. Aun así, en otros estudios con silenciamiento condicionado en glía han conseguido una reducción de motricidad significativa desde el 10° día<sup>16,17,20</sup>. El dato más significativo se obtuvo para el silenciamiento de *Caz*, donde se pudo observar un déficit motor desde el día 10, lo que concuerda con lo publicado hasta el momento para el silenciamiento en glía y que se ha podido comprobar también en otros tejidos de la UNM, con especial afectación en el tejido muscular. Mientras, en el caso de *TbphB* los resultados fueron menos eficaces que el resto como se puede observar en la figura 19.B, lo que concuerda con el menor silenciamiento molecular obtenido en el western blot. Este es un dato determinante ya que, en contraposición a lo observado en glía, los estudios realizados para motoneurona y músculo con silenciamiento condicionado en *TbphB* adquirirían fenotipos más agresivos, lo que apoyaría la hipótesis de una menor toxicidad del silenciamiento selectivo en glía y la necesidad de la contribución conjunta con otros elementos de la UNM para generar fenotipos más tóxicos. En lo referente a los modelos *Tbph401* y *Tbph9*, la principal diferencia observada fue que el primero adquirió un fenotipo con disminución de motricidad desde el 10° día, como era de esperar dada su mayor eficacia a la hora de generar el silenciamiento.

Cabe destacar que durante este TFG se han observado un comportamiento fenotípico no concordante con el habitual en el grupo control (5905) del experimento, lo que ha podido afectar a la detección de la severidad de los resultados. El laboratorio de Biodonostia está trabajando en ello para solventar esta posible fuente de sesgo aumentando considerablemente la población a estudio y valorando la inclusión de otros modelos alternativos *wild-type* como controles.

Los datos obtenidos en el estudio de la longevidad no han sido especialmente concordantes con lo esperado en base a la bibliografía<sup>17,19,20</sup>. En este caso, incluso se han obtenido datos que podrían orientar a un papel protector del silenciamiento condicionado en glía, similares a los obtenidos en estudios en motoneurona y, en especial, en referencia a los modelos con silenciamiento en Caz, donde en ambos estudios se ha comprobado un aumento significativo de la esperanza de vida en comparación con el control. En nuestro estudio, el modelo con silenciamiento en Tbph401 también ha tenido una mayor supervivencia respecto al control, lo que resulta especialmente complicado de explicar en comparación con los resultados obtenidos en los test anteriores. En cambio, los resultados en el modelo TbphB y Tbph9 han resultado en una disminución significativa de la longevidad, lo que nos orientaría hacia la hipótesis de que independientemente del locus seleccionado, el silenciamiento de Tbph resulta eficaz para provocar toxicidad celular, pero con una eficacia variable. Al comparar los resultados con los obtenidos en estudios en tejido muscular, podemos comprobar que los modelos Tbph han sido menos eficaces en generar perfiles tóxicos significativos, ya que en músculo el efecto del silenciamiento tanto en Tbph como en Caz resultó en una disminución significativa de la longevidad en comparación con el control. La gran variabilidad de los efectos obtenidos en el estudio podría explicarse, al igual que en el test locomotor, por la ineficacia que ha demostrado el modelo control ya que los resultados no han sido los esperados y que, como se ha comentado, se solventará en próximos estudios utilizando poblaciones más grandes y valorando la utilización de otros modelos *wild-type*.

Finalmente, la realización del estudio con el compuesto AS1842856 no obtuvo resultados significativos a la hora de reducir el efecto tóxico del silenciamiento en glía, en contraposición a lo observado tanto en motoneurona como en el tejido muscular, siendo este último el utilizado para generar la patente del fármaco. En estos casos, la corrección del fenotipo obtuvo un éxito rotundo tanto en la capacidad motora como en la longevidad para los modelos Tbph y en Caz. Esto puede deberse al papel que adquiere la glía como colaborador con los otros tipos celulares de la UNM, por lo que, al producirse silenciamientos dirigidos con menor eficacia, el resultado de la aplicación del tratamiento también alumbra resultados menos eficaces. Más estudios son requeridos para corroborar los hallazgos de este trabajo.

A partir de los resultados obtenidos, en especial los del estudio mediante inmunoanálisis, podemos confirmar que *Drosophila melanogaster* es un modelo eficaz para estudio de mutaciones genéticas relacionadas con TDP-43, al igual que ocurre en los estudios en motoneurona y tejido muscular, lo que nos lleva a ratificar los modelos de mosca como una base importante para el estudio genético de enfermedades neurodegenerativas. Del mismo modo, la utilización del sistema reportero repo-Gal4

ha demostrado su eficacia a la hora de dirigir la formación de genotipos viables, demostrando así su gran utilidad técnica en los estudios *in vivo*.

La implicación y relevancia del astrocito como soporte nutricional y metabólico para la salud y funcionalidad de la motoneurona, en el contexto de la UNM, está fuera de toda duda. Sin embargo, en el estudio de la etiopatogenia de la ELA los resultados fenotípico-funcionales obtenidos en este TFG sugieren que el papel de la glía podría ser de menor potencial que la relacionada con la motoneurona y el tejido muscular, en especial en el estudio en modelos animales como la mosca. Una explicación a este hecho podría ser el ratio diferencial neurona/glía entre vertebrados vs. mosca, ya que en animales vertebrados este ratio es de 1:10 en comparación con ratios de 10:1 que obtenemos en modelos de mosca<sup>16</sup>. Esto podría indicar que el tejido glial en mosca es un tejido más específico con una reducción de su actividad global en la estructura sináptica, lo que por ende reduciría su participación en términos globales en el desarrollo de alteraciones de la misma. De todas maneras, estudios realizados en modelos celulares han demostrado la aparición de mutaciones de TDP-43 en glía, con diferentes grados de contribución al desarrollo degenerativo celular según la localización de la mutación<sup>26</sup>, lo que añade relevancia a el estudio de diferentes locus como se ha hecho en este TFG.

Con vistas al futuro, resulta especialmente interesante continuar con el estudio de la participación de la glía dentro de la unión neuromuscular como elemento colaborador en la patogénesis de la ELA, tal y como se está desarrollando actualmente por el grupo de enfermedades neurodegenerativas en el Instituto Biodonostia, comprobando también la posibilidad del uso de inhibidores de FoxO como posible vía terapéutica que en un futuro pueda ser eficaz en paliar las fatales consecuencias de esta enfermedad.

Con los resultados obtenidos en este estudio podemos fortalecer la hipótesis que incide en el papel colaborador de la glía en el desarrollo de la enfermedad y no tanto en su capacidad autónoma de generar eventos que *persé* provoquen la degeneración de motoneurona. Resultados que, por otra parte, coinciden con trabajos publicados, donde varios estudios han demostrado que tanto la sobreexpresión como el silenciamiento de TDP-43 en glía causan una clara disminución de la capacidad de actividad de la UNM comparable a la obtenida en motoneurona, pero con una menor eficacia. De este modo, a falta de estudios moleculares más exhaustivos que se realizarán en el laboratorio de Biodonostia, nos orientaría a pensar que el papel de la glía en este proceso se basa en su potencial contribución a la hora de generarse alteraciones más marcadas en la motoneurona favoreciendo la aparición de fenotipos más agresivos de la enfermedad y no tanto en su autonomía como foco de mayor toxicidad dentro de la UNM.

## 6. CONCLUSIONES:

- 1.- La disminución de los niveles de proteína de Tbp1 y Caz, ortólogos de los genes humanos, TARBP y FUS respectivamente, aseguran que el silenciamiento sobre estos genes fue exitoso
- 2.-Las pruebas fenotípico-funcionales realizadas detectaron cambios significativos, especialmente una disminución en la actividad locomotora de las moscas con silenciamiento en células de la glía de los genes Tbp1 y Caz, confirmando su validez como modelo de enfermedad de la ELA
- 3.- El tratamiento con el compuesto AS1842856 no fue capaz de revertir las alteraciones detectadas en el modelo de enfermedad.
- 4.- El silenciamiento en células de la glía de Tbp1 y Caz realizado en este TFG, junto con los silenciamientos de estos mismos genes en motoneurona y músculo, sugieren que la Glía puede contribuir a la degeneración de motoneurona característica de la ELA, pero a falta de la realización de estudios moleculares exhaustivos, no sería el desencadenante del mismo.

## 7. RECONOCIMIENTOS / CONFLICTO DE INTERÉS / AGRADECIMIENTOS.

El actual TFG ha sido respaldado por el Instituto BioDonostia y ha sido reconocido por el Gobierno Vasco bajo las becas Ikerbasque para la colaboración del alumnado universitario en investigación.

No se declaran conflictos de interés.

Agradecer al dr. Gorka Gereñu y a todo el equipo de enfermedades neurodegenerativas por el apoyo y toda la experiencia adquirida al realizar este trabajo. También agradecer al equipo coordinador de la UD Donostia, con especial mención a los doctores Joseba Landa e Inma Ruiz por el apoyo y sacrificio por el alumnado para conseguir la mejor docencia posible en tiempos de COVID.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Amyotrophic lateral sclerosis- Clinical Overview [Internet]. Clinicalkey.es. 2021 [cited 4 February 2021]. Available from: [https://www.clinicalkey.es#!/content/clinical\\_overview/67-s2.0-ae9519b9-88ff-4ae2-92a8-35427aabf65a?scrollTo=%23terminology-heading-5](https://www.clinicalkey.es#!/content/clinical_overview/67-s2.0-ae9519b9-88ff-4ae2-92a8-35427aabf65a?scrollTo=%23terminology-heading-5)
2. Shaw P. Esclerosis lateral amiotrófica y otras enfermedades de la neurona motora. Tratado de medicina interna. 25th ed. Elsevier España; 2017. p. 2522-2526.
3. Maragakis N, Galvez-Jimenez N. Epidemiology and pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis [Internet]. Uptodate.com. 2020 [cited 4 February 2021]. Available

from: [https://www.uptodate.com/contents/epidemiology-and-pathogenesis-of-amyotrophic-lateral-sclerosis?search=Epidemiology%20and%20pathogenesis%20of%20amyotrophic%20lateral%20sclerosis&source=search\\_result&selectedTitle=1~150&usage\\_type=default&display\\_rank=1](https://www.uptodate.com/contents/epidemiology-and-pathogenesis-of-amyotrophic-lateral-sclerosis?search=Epidemiology%20and%20pathogenesis%20of%20amyotrophic%20lateral%20sclerosis&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1)

4. Rojas P, Ramírez A, Fernández-Albarral J, López-Cuenca I, Salobar-García E, Cadena M et al. Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Neurodegenerative Motor Neuron Disease With Ocular Involvement. *Frontiers in Neuroscience*. 2020;14.
5. Longinetti E, Fang F. Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: an update of recent literature. *Current Opinion in Neurology*. 2019;32(5):771-776.
6. Epidemiología | FUNDELA [Internet]. Fundela.es. 2021 [cited 4 February 2021]. Available from: <https://www.fundela.es/ela/epidemiologia/>
7. Bhattacharya R, Harvey R, Abraham K, Rosen J, Mehta P. Amyotrophic lateral sclerosis among patients with a Medicare Advantage prescription drug plan; prevalence, survival and patient characteristics. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*. 2019;20(3-4):251-259.
8. Masrori P, Van Damme P. Amyotrophic lateral sclerosis: a clinical review. *European Journal of Neurology*. 2020;27(10):1918-1929.
9. Roote J, Prokop A. How to design a genetic mating scheme: a basic training package for *Drosophila* genetics [Internet]. figshare; 2017 [cited 2021Apr14].
10. Frickenhaus M, Wagner M, Mallik M, Catinozzi M, Storkebaum E. Highly efficient cell-type-specific gene inactivation reveals a key function for the *Drosophila* FUS homolog cabeza in neurons. *Scientific Reports*. 2015;5(1).
11. Sasayama H, Shimamura M, Tokuda T, Azuma Y, Yoshida T, Mizuno T et al. Knockdown of the *Drosophila* Fused in Sarcoma (FUS) Homologue Causes Deficient Locomotive Behavior and Shortening of Motoneuron Terminal Branches. *PLoS ONE*. 2012;7(6):e39483.
12. Estes P, Daniel S, McCallum A, Boehringer A, Sukhina A, Zwick R et al. Motor neurons and glia exhibit specific individualized responses to TDP-43 expression in a *Drosophila* model of amyotrophic lateral sclerosis. *Disease Models & Mechanisms*. 2013;6(3):721-733.
13. Bloomington I, Bloomington I, Bloomington I, Us A, Newsletter B, Policy A et al. Bloomington *Drosophila* Stock Center [Internet]. Bloomington *Drosophila* Stock Center. 2021 [cited 4 February 2021]. Available from: <https://bdsc.indiana.edu/>
14. Zufiría M, Gil-Bea F, Fernández-Torrón R, Poza J, Muñoz-Blanco J, Rojas-García R et al. ALS: A bucket of genes, environment, metabolism and unknown ingredients. *Progress in Neurobiology*. 2016;142:104-129.
15. Zufiría M. Glycolysis and lactate production are prominently repressed in cellular models of amyotrophic lateral sclerosis.

16. Diaper D, Adachi Y, Lazarou L, Greenstein M, Simoes F, Di Domenico A et al. *Drosophila* TDP-43 dysfunction in glia and muscle cells cause cytological and behavioural phenotypes that characterize ALS and FTL. *Human Molecular Genetics*. 2013;22(19):3883-3893.
17. Kim T, Song B, Lee I. *Drosophila* Glia: Models for Human Neurodevelopmental and Neurodegenerative Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(14):4859.
18. Godena V, Romano G, Romano M, Appocher C, Klima R, Buratti E et al. TDP-43 Regulates *Drosophila* Neuromuscular Junctions Growth by Modulating Futsch/MAP1B Levels and Synaptic Microtubules Organization. *PLoS ONE*. 2011;6(3):e17808.
19. Diaper D, Adachi Y, Sutcliffe B, Humphrey D, Elliott C, Stepto A et al. Loss and gain of *Drosophila* TDP-43 impair synaptic efficacy and motor control leading to age-related neurodegeneration by loss-of-function phenotypes. *Human Molecular Genetics*. 2013;22(8):1539-1557.
20. Romano G, Appocher C, Scorzeto M, Klima R, Baralle F, Megighian A et al. Glial TDP-43 regulates axon wrapping, GluRIIA clustering and fly motility by autonomous and non-autonomous mechanisms. *Human Molecular Genetics*. 2015;24(21):6134-6145.
21. Layalle S, They L, Ourghani S, Raoul C, Soustelle L. Amyotrophic Lateral Sclerosis Genes in *Drosophila melanogaster*. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(2):904.
22. Romano G, Holodkov N, Klima R, Grilli F, Guarnaccia C, Nizzardo M et al. Downregulation of glutamic acid decarboxylase in *Drosophila* TDP-43-null brains provokes paralysis by affecting the organization of the neuromuscular synapses. *Scientific Reports*. 2018;8(1).
23. Wang J, Brent J, Tomlinson A, Shneider N, McCabe B. The ALS-associated proteins FUS and TDP-43 function together to affect *Drosophila* locomotion and life span. *Journal of Clinical Investigation*. 2011;121(10):4118-4126.
24. Romano M, Feiguin F, Buratti E. *Drosophila* Answers to TDP-43 Proteinopathies. *Journal of Amino Acids*. 2012;2012:1-13.
25. McGurk L, Berson A, Bonini N. *Drosophila* as an In Vivo Model for Human Neurodegenerative Disease. *Genetics*. 2015;201(2):377-402.
26. Philips T, Rothstein J. Glial cells in amyotrophic lateral sclerosis. *Experimental Neurology*. 2014;262:111-120.
27. Kim T, Song B, Lee I. *Drosophila* Glia: Models for Human Neurodevelopmental and Neurodegenerative Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(14):4859.
28. Venken K, Simpson J, Bellen H. Genetic Manipulation of Genes and Cells in the Nervous System of the Fruit Fly. *Neuron*. 2011;72(2):202-230.

29. Ferraiuolo L, Kirby J, Grierson A, Sendtner M, Shaw P. Molecular pathways of motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Reviews Neurology*. 2011;7(11):616-630.
30. Donde A, Sun M, Jeong Y, Wen X, Ling J, Lin S et al. Upregulation of ATG7 attenuates motor neuron dysfunction associated with depletion of TARDBP/TDP-43. *Autophagy*. 2019;16(4):672-682.
31. Cragnaz L, Klima R, De Conti L, Romano G, Feiguin F, Buratti E et al. An age-related reduction of brain TBPH/TDP-43 levels precedes the onset of locomotion defects in a Drosophila ALS model. *Neuroscience*. 2015;311:415-421.
32. Romano G, Klima R, Buratti E, Verstreken P, Baralle F, Feiguin F. Chronological requirements of TDP-43 function in synaptic organization and locomotive control. *Neurobiology of Disease*. 2014;71:95-109.
33. Strah N, Romano G, Introna C, Klima R, Marzullo M, Ciapponi L et al. TDP-43 promotes the formation of neuromuscular synapses through the regulation of Disc-large expression in Drosophila skeletal muscles. *BMC Biology*. 2020;18(1).
34. Romano G, Appocher C, Scorzeto M, Klima R, Baralle F, Megighian A et al. Glial TDP-43 regulates axon wrapping, GluRIIA clustering and fly motility by autonomous and non-autonomous mechanisms. *Human Molecular Genetics*. 2015;24(21):6134-6145.
35. Salih D, Brunet A. FoxO transcription factors in the maintenance of cellular homeostasis during aging. *Current Opinion in Cell Biology*. 2008;20(2):126-136.
36. Coyne A, Siddegowda B, Estes P, Johannesmeyer J, Kovalik T, Daniel S et al. Futsch/MAP1B mRNA Is a Translational Target of TDP-43 and Is Neuroprotective in a Drosophila Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Journal of Neuroscience*. 2014;34(48):15962-15974.
37. Maiese K, Chong Z, Hou J, Shang Y. Oxidative stress: Biomarkers and novel therapeutic pathways. *Experimental Gerontology*. 2010;45(3):217-234.
38. Chong Z, Lin S, Maiese K. The NAD<sup>+</sup> Precursor Nicotinamide Governs Neuronal Survival During Oxidative Stress Through Protein Kinase B Coupled to FOXO3a and Mitochondrial Membrane Potential. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2004;24(7):728-743.
39. Nechipurenko I, Broihier H. FoxO limits microtubule stability and is itself negatively regulated by microtubule disruption. *Journal of Cell Biology*. 2012;196(3):345-362.
40. DeJesus-Hernandez, M. *et al.* Expanded GGGGCC Hexanucleotide Repeat in Noncoding Region of C9ORF72 Causes Chromosome 9p-Linked FTD and ALS. *Neuron* **72**, 245–256 (2011).
41. Renton, A. E. *et al.* A Hexanucleotide Repeat Expansion in C9ORF72 Is the Cause of Chromosome 9p21-Linked ALS-FTD. *Neuron* **72**, 257–268 (2011).
42. Kwiatkowski TJ Jr, Bosco DA, Leclerc AL, *et al.* Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral

- sclerosis. *Science* 2009; 323: 1205–1208.
43. Pulver, S. R. & Berni, J. The fundamentals of flying: Simple and inexpensive strategies foremploying *Drosophila* genetics in neuroscience teaching laboratories. *J. Undergrad. Neurosci.Educ.* 11, (2012).
  44. Kavi, H. H., Fernandez, H. R., Xie, W. & Birchler, J. A. RNA silencing in *Drosophila*. *FEBS Lett.* 579,5940–5949 (2005).
  45. Bèlanger, M., Allaman, I., & Magistretti, P. J. (2011). Brain Energy Metabolism: Focus on Astrocyte-Neuron Metabolic Cooperation. *Cell Metabolism*, 14(6), 724–738. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.08.016>
  46. Robberecht, W. & Philips, T. The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 248–264 (2013).
  47. TARBDP Gene (Protein coding). <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TARBDP>.
  48. Shorter, J. The mammalian disaggregase machinery: Hsp110 synergizes with Hsp70 and Hsp40 to catalyze protein disaggregation and reactivation in a cell-free system. *PLoS One* 6, (2011).
  49. Cascella, R. et al. Quantification of the Relative Contributions of Loss-of-function and Gain-of-function Mechanisms in TAR DNA-binding Protein 43 (TDP-43) Proteinopathies. *J. Biol. Chem.* 291, 19437–19448 (2016).
  50. Higashi, S., Tsuchiya, Y., Araki, T., Wada, K. & Kabuta, T. TDP-43 physically interacts with amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant CuZn superoxide dismutase. *Neurochem. Int.* 57, 906–913 (2010).
  51. FUS Gene (Protein coding). <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FUS>.
  52. Chen, S., Sayana, P., Zhang, X. & Le, W. Genetics of amyotrophic lateral sclerosis: An update. *Mol. Neurodegener.* 8, 1 (2013).
  53. Khalfallah Y, Kuta R, Grasmuck C, Prat A, Durham H, Vande Velde C. TDP-43 regulation of stress granule dynamics in neurodegenerative disease-relevant cell types. *Scientific Reports.* 2018;8(1).
  54. Tong, J., Huang, C., Bi, F., Wu, Q., Huang, B., Liu, X., Li, F., Zhou, H., & Xia, X. (2013). Expression of ALS-linked TDP-43 mutant in astrocytes causes non-cell-autonomous motor neuron death in rats. *The EMBO Journal*, 1–10. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.122>.
  55. Yan, X., Shi, Z. F., Xu, L. X., Li, J. X., Wu, M., Wang, X. X., Jia, M., Dong, L. P., Yang, S. H., & Yuan, F. (2017). Glutamate Impairs Mitochondria Aerobic Respiration Capacity and Enhances Glycolysis in Cultured Rat Astrocytes. *Biomedical and Environmental Sciences*, 30(1), 44–51. <https://doi.org/10.3967/bes2017.005>