

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

ESTUDIO DEL MECANISMO SUBYACENTE EN LA DEFICIENCIA MIOGÉNICA EN MODELO CELULAR DE ELA Y SU IMPLICACIÓN EN LA REGENERACIÓN MUSCULAR

Egilea /Autor:

MAIALEN ATIN CARRION

Zuzendaria / Director/a:

ADOLFO LÓPEZ DE MUNAIN

© 2018Maialen Atin Carrion

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. HIPÓTESIS, OBJETIVOS E HITOS	6
2.1. HIPÓTESIS	6
2.2. OBJETIVOS	6
2.3. HITOS	6
3. MATERIAL Y MÉTODO	6
3.1. CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO MIOGÉNICO EN LA LÍNEA 8220 DE MIOBLASTOS, <i>WILD TYPE</i>	6
3.1.1. Cultivo de la línea celular 8220 <i>wild type</i>	6
3.1.2. Diferenciación celular	7
3.1.3. Extracción de proteínas	7
3.1.4. Análisis de las proteínas mediante la técnica de <i>Western Blot</i>	7
3.1.5. Medición de ROS Intracelular	7
3.2. CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO MIOGÉNICO EN LAS LÍNEAS CELULARES SHRNA, SHTDP43, SHFUS Y SHSOD1	8
3.2.1 Cultivo de las líneas celulares ShRNA, ShTDP43, ShFUS y ShSOD1	8
3.2.2 Diferenciación celular	8
3.2.3 Extracción de proteínas	8
3.2.4 Análisis de las proteínas mediante la técnica de <i>Western Blot</i>	8
3.3 INMUNNOFLUORESCENCIA	9

4. RESULTADOS	10
4.1. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DEL PROCESO MIOGÉNICO EN LA LÍNEA 8220 DE MIOBLASTOS WILD TYPE Y CARACTERIZACIÓN DEL MISMO	10
4.1.1. Mioblastos en cultivo a diferentes confluencias y en primeros días de diferenciación miogénica	10
4.1.2. Expresión de la proteína MyoD a confluencias 90%, 100%, día 1 y día 2	11
4.1.3. Expresión de la proteína Miogenina a confluencias 90%, 100%, día 1 y día 2	12
4.1.4. Expresión de las proteínas TDP43, FUS y SOD1 a confluencias 90%, 100%, día 1 y día 2	13
4.1.5. Medición de ROS intracelular	14
4.2. ESTUDIO DEL PROCESO MIOGÉNICO EN LAS LÍNEAS CELULARES SHRNA, FUS, TDP43 Y SOD1 Y CARACTERIZACIÓN DE LOS MISMOS	15
4.2.1 Mioblastos silenciados en cultivo a diferentes confluencias y en primeros días de diferenciación miogénica	15
4.2.1.1 Confluencia 90%	15
4.2.1.2 Confluencia 100%	16
4.2.1.3 Día 0-1 post diferenciación	17
4.2.1.4 Día 2 post diferenciación	18
4.2.2 Caracterización de la miogénesis por líneas celulares	19
4.2.2.1 ShRNA	19
4.2.2.2 FUS	20
4.2.2.3 TDP43	22
4.2.2.4 SOD1	24
4.2.3 Análisis de las proteínas promiogénicas MyoD y Miogenina mediante la técnica de <i>Western Blot</i>	25
4.2.4 Análisis de proteínas presentes en el miotubo características del proceso de miogénesis	26

4.3 ANÁLISIS MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA DE LAS PROTEÍNAS MYOD Y MIOGENINA	29
4.3.1 MyoD	29
4.3.2 Miogenina	33
5 DISCUSIÓN	35
6 BIBLIOGRAFÍA	38

1. INTRODUCCIÓN

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), también conocida como Enfermedad de Lou Gehrig¹⁵, Enfermedad de Charcot^{13,15,16,17} en Francia, o genéricamente EMN (Enfermedad de motoneurona) es una enfermedad neurodegenerativa progresiva que afecta a las neuronas motoras del cerebro, tronco de encéfalo y médula espinal. La enfermedad cursa con una degeneración combinada de las motoneuronas superior e inferior, que son las células encargadas de transmitir la orden del movimiento voluntario del cerebro a los músculos. Cuando mueren las neuronas motoras, el cerebro pierde la capacidad de iniciar y controlar el movimiento de los músculos^{13,14}.

La incidencia de ELA en Europa y Norte América es de unos 2.7 casos/100000 habitantes por año^{1,2,3 4} y no ha aumentado desde los años 90⁶. En el año 2008 la prevalencia de esta enfermedad era de 4.6/100000^{5,6,7,8}. El riesgo de sufrirla para los 70 años es de 1 caso /400-1000 personas¹⁴. Varios estudios han descrito un ligero predominio en hombres (1.5:1)^{8,9} pero hay otros estudios que apuntan que no hay diferencias significativas entre sexos^{5,10}. La edad media de comienzo está en los 64 años^{14, 2,3}.

Varios estudios indican que la ELA es una enfermedad relacionada con la edad que tiene una susceptibilidad mayor según se avanza en la edad, siendo los más susceptibles los mayores de 70 años de edad. Pese a que muchos estudios sugieran que esta sea una enfermedad que aumenta con la edad, después de ese pico de incidencia a los 70 años, le sigue un descenso de la incidencia alrededor de los 80 años^{3,6,41,42,43}

La supervivencia media de los pacientes afectados por ELA es de unos 3 años, pero depende de la precocidad con la que se vea afectada la función respiratoria y la deglución y de la calidad de los cuidados paliativos. Solo un 10% de los pacientes vive más de 10 años¹⁴.

La complejidad y heterogeneidad de la enfermedad hacen que su diagnóstico diferencial sea todo un reto^{14,21}. El diagnóstico de la ELA es principalmente clínico y se basa en la exclusión de otras patologías que pueden producir un cuadro clínico parecido²³. Por ello es importante que en este proceso se obtenga una buena historia

clínica, llevar a cabo una exploración minuciosa, unas pruebas de laboratorio, de electrodiagnóstico, de neuroimagen y en algunos casos test genéticos^{23,24}.

En la actualidad solo hay un medicamento aprobado en Europa para tratar esta enfermedad: el riluzol. El edaravone es otro fármaco aprobado sólo en Estados Unidos y Japón pero no está aprobado por la agencia europea de medicamentos y actualmente se está considerando la autorización del Masitinib. El riluzol aumenta la supervivencia en 3 meses pero no produce ninguna diferencia significativa en cuanto a fuerza muscular³⁰.

El mejor manejo para los pacientes con ELA es el proporcionado por unidades multidisciplinares con el trabajo conjunto de neurólogos, psicólogos, fisioterapeutas, enfermería etc^{30,31}. La esperanza de vida para los pacientes con una ELA espinal es de 3-5 años y de 2-3 años en los que comienzan por parálisis bulbar¹⁴.

La mayoría de los casos de ELA son esporádicos y sólo entre un 5 y 15% de los casos son familiares^{14,4}. En los casos de ELA esporádica intervienen tanto factores endógenos (genéticos) como exógenos (ambientales y relacionados con el estilo de vida)⁴. Pueden haber ciertos factores que podrían estar relacionados con la aparición de la enfermedad; exposición a tóxicos o a ciertos productos químicos (metales pesados, pesticidas, herbicidas, disolventes, etc), ejercicio físico excesivo³⁹, traumatismos y el tabaquismo⁴. Aunque se conozcan más de 30 genes diferentes relacionados con la ELA, la importancia de la herencia poligénica (donde varios genes determinan un fenotipo de manera epistática) y la heterogeneidad alélica (donde un solo gen es responsable de efectos fenotípicos o caracteres distintos) es evidente. Hasta un 70% de los casos familiares se relacionan con los siguientes genes: C9orf72, TDP43 (TARDBP), SOD 1 y FUS^{4,5,11,12,30}.

En el 97% de los pacientes con ELA se ha descrito la proteinopatía relacionada con TDP43, con depleción de TDP43 en el núcleo celular, resultando en una pérdida de función de esta proteína^{34,35}. TDP43 es una proteína ubicua y muy conservada que se encuentra principalmente en el núcleo de las células. Sin embargo en esta patología se presentan agregados de TDP43 en el citoplasma de las neuronas. Las funciones de la TDP43 son varias: represión de la transcripción, unión y regulación de diferentes especies de ARN, ensamblaje o splicing de ARN mensajero (ARNm), unión a ARN

no codificante de pequeño tamaño como son los microARNs (miARNs). Hay varias investigaciones que sugieren que la pérdida de función podría ser un factor fundamental responsable de la neurodegeneración. Se ha observado presencia de inclusiones de TDP43^{34,35,36,37,38}. El hecho de que en la ELA la proteína TDP43 forme agregados en el citoplasma podría deberse a la pérdida de la función de esta proteína en el núcleo, o a la propia presencia de los agregados tóxicos en el citoplasma. Además, en ciertos subtipos de ELA se observan otro tipo de agregados proteínicos, como inclusiones de conglomerado de neurofilamentos hialinos y acúmulo de proteína SOD1 mal plegada. Las mutaciones en ciertos genes alteran el plegamiento de las proteínas que codifican, las cuales directa o indirectamente pueden dañar la maquinaria proteosomal o autofágica de la célula, lo que conduce a una pérdida de la homeostasis proteica; de hecho en la ELA hay genes alterados que están relacionados con esta función. Los genes asociados con la ELA familiar codifican proteínas que pueden promover el mal funcionamiento del sistema ubiquitin-proteosoma.

Las proteínas de alto peso molecular podrían mediar en la propagación celular de la enfermedad, enlazando la progresión de la ELA con un mecanismo priónico, como también ha sido sugerido en enfermedades causadas por acúmulos de tau y α -sinucleína⁴⁰.

La clínica de la Esclerosis Lateral Amiotrófica depende de la implicación de la motoneurona superior, la inferior o ambas. Los pacientes pueden presentar síntomas predominantes de motoneurona superior como espasticidad, hiperreflexia y debilitamiento al principio, apareciendo posteriormente los síntomas de motoneurona inferior como debilidad, atrofia y fasciculaciones. Contrariamente a esto, otros pacientes pueden debutar con síntomas de motoneurona inferior y luego aparecer síntomas de motoneurona superior.

La localización de la neurodegeneración, clasifica la ELA topográficamente en dos tipos: ELA espinal o clásica y ELA bulbar.

Un tercio de los pacientes tiene un inicio de ELA bulbar que se caracteriza por disartria progresiva, disfagia y labilidad emocional. En algunos casos, la enfermedad tiene un inicio de extremidades, lo que se denomina ELA espinal. En general su

curso es asimétrico (la enfermedad progresa de modo diferente en cada parte del cuerpo)⁴, puede aparecer tanto en parte superior como inferior del cuerpo y se caracteriza por una hiperreflexia, un signo de Babinski y espasticidad. Un 5% de los pacientes puede empezar con problemas respiratorios o una pérdida de peso importante.

Aunque la mayoría de los pacientes pueden presentar un fenotipo de ELA puramente motor, hay otros casos, en los que se asocian un fenotipo cognitivo y motor. Hasta el 50% de los pacientes pueden presentar alteraciones cognitivas^{7,10}. Los pacientes con ELA no suelen tener afectación de carácter autonómica (como cardiovascular, gastrointestinal o disfunción de vejiga)³⁰.

Los rasgos neuropatológicos principales de la ELA son atrofia del córtex motor, esclerosis del tracto piramidal y atrofia del músculo esquelético; esta atrofia se presenta en la musculatura de la extremidades, de la fonación, de la deglución y de la respiración, sin estar afectos la musculatura extrínseca ocular y la musculatura estriada miocárdica, que en realidad pertenece al sistema nervioso autónomo. La atrofia muscular consiste en el deterioro progresivo del músculo que conduce a ciertos cambios funcionales, fisiológicos y estructurales. La atrofia muscular en la ELA se debe a la propia denervación en la placa motora²⁰.

En este trabajo partimos de la hipótesis de que en la ELA exista un defecto intrínseco independiente de la afectación de la motoneurona en el proceso de maduración y/o regeneración del músculo esquelético conocido como **miogénesis**.

La miogénesis consiste en la transformación de las células madre embrionarias hacia células maduras del tejido muscular, las cuales sufren un proceso de diferenciación celular para dar lugar a la unidad estructural y funcional del músculo; la fibra muscular o miocito.

Las células precursoras del músculo (células satélite) son células miógenas de tipo mesenquimal que han sufrido una restricción que les ha comprometido a formar músculo⁴⁵. Estas células se dividen varias veces antes de llegar a una división mitótica terminal y convertirse en mioblastos postmitóticos^{25,26}.

La base molecular para la maduración de las células satélite es la acción de distintos miembros pertenecientes a las familias de los factores reguladores miógenos que

activan genes específicos del músculo^{25,26}. Otros factores de crecimiento tales como, el FGF y el factor de crecimiento transformador- β (TGF β), intervienen en la proliferación de células miógenas. Gracias a los factores reguladores miógenos, las células miógenas estimulan la síntesis de la proteína del ciclo celular p21 que promueve la salida definitiva del ciclo. En ese momento, los mioblastos postmitóticos se fusionan con otras células iguales para formar un miotubo multinucleado^{25,26}, proceso que se acompaña por la activación de la expresión de proteínas del sarcómero.

La primera familia de factores reguladores miógenos que fue caracterizada fue la familia MyoD^{25,26}. Dentro de ella destacan las proteínas reguladoras Pax 3, Pax 7, myf5 y MyoD. Tanto Pax3 como myf5 pueden activar MyoD, haciendo que algunas células del dermomiótomo queden encaminadas hacia la formación de músculo. A su vez, las proteínas MyoD y myf5 activan los genes de la miogenina y Mrf5, que promueven la formación de miotubos y miofibras. De tal manera que los mioblastos con mayores niveles de MyoD se fusionan y forman fibras musculares alargadas y multinucleadas en los que los niveles de miogenina adquieren su punto máximo⁴⁴.

Una vez ya formado el miotubo, se sintetizan una amplia variedad de proteínas, entre ellas encargadas de regular la contracción muscular, troponina y tropomiosina. Estas proteínas se ensamblan en miofibrillas, que a su vez se organizan de manera precisa en agregados de unidades funcionales contráctiles denominadas sarcómeros. A medida que los miotubos se llenan de miofibrillas, sus núcleos que seguían una disposición en cadenas centrales regulares, migran hacia la periferia de dicha estructura. En este estadio se considera que el miotubo se ha diferenciado en fibra muscular, que es la fase final en el proceso de diferenciación^{25,26}.

Hasta ahora se ha afirmado que la causa de la atrofia muscular en la ELA es la propia denervación producida por la degeneración de las motoneuronas. Sin embargo, la atrofia muscular observada en los pacientes con Esclerosis Lateral Amiotrófica podría tener una causa primaria en el músculo en la que estaría implicado el proceso de miogénesis⁴⁷.

2. HIPÓTESIS, OBJETIVOS E HITOS

2.1 HIPÓTESIS

La atrofia muscular característica de la Esclerosis Lateral Amiotrófica podría ser secundaria no sólo a la denervación derivada de la muerte de las motoneuronas sino a un proceso primario que afecta a la miogénesis independiente de la degeneración y muerte de la MN. Este hecho puede ser el evento patogénico primario en algunas formas de ELA.

2.2 OBJETIVOS

Estudio de la implicación de los genes implicados en las formas mendelianas de ELA; TDP43, SOD1 y FUS en la diferenciación miogénica mediante:

- Caracterización de su expresión durante la diferenciación miogénica de mioblastos humanos inmortalizados.
- Determinación del efecto de la deficiencia de TDP43, SOD1 y FUS en el proceso de diferenciación miogénica.

2.3 HITOS

- Caracterización de la miogénesis en mioblastos *wild type* (WT).
- Caracterización de la miogénesis en mioblastos silenciados (ShRNA, ShTDP43, ShSOD1, ShFUS).
- Inmunofluorescencia de MyoD y Miogenina en las líneas ShTDP43, ShSOD1 y ShFUS.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Caracterización del proceso miogénico en la línea 8220 de mioblastos, *wild type*.
 - 1.1 Cultivo de la línea celular 8220 *wild type* en el medio SGM (FBS 50ml, supplement mix, glutamax 6ml, gentamicina 500µl). Levantamiento de placas: tripsina al 0.05%, DPBS (Dulbecco's phosphate buffered saline, Gibco) y suero fetal bovino al 10%.

1.2 Diferenciación celular. Para ello se ha utilizado medio 1 (DMEM 49.4ml, Apotransferrina (10mg/ml) 500µl, insulina 50µl, gentamicina 50µl) cuando las placas con las células de mioblastos estaban a confluencia 100% y medio 2 (neurobasal A 48ml, B27 (50x) 1ml, glutamax (100x) 500µl, laminin (1mg/ml) 200µl, BDNF (10µg/ml) 100 µl, shh (25 µg/ml) 100 µl, NT3 (10 µg/ml) 100 µl, agrina (100 µg/ml) 50 µl, gentamicina 50 µl, CNTF (20 µg/ml) 12.5 µl, IGF1 (100 µg/ml) 5 µl) en el día 2 post diferenciación.

1.3 Extracción de proteínas con *buffer* 4x (volumen total 8ml, tris 2M 1.25ml, glicerol 2ml, ph 7.5, SDS 25% 2.56ml, azul bromofenol 0.04g, 100µl de β-mercaptoetanol al 99%). Cuantificación de proteínas, para ello se utiliza DPBS (Dulbecco's phosphate buffered saline, Gibco), SDS y el espectrofotómetro.

1.4 Análisis de las proteínas mediante la técnica de *Western Blot*: Gel Mini Protean TGX Precast Gels, Bio Rad, 4-20%, 15-well comb, 15µl/well, el *Running Buffer* (Tris 3.03g, glicina 14.4g, SDS 1.5g, H₂O 0.1l), el Transfer Buffer (Tris 3.02g, glicina 14.4g, H₂O csp 0.1l), el *Blocking Solution* (goat milk 2.5g, TBST csp 50ml), la Membrana Immuno-Blot PVDF Membrane for protein blotting sample, Bio Rad, 7x8.5cm, 0.2µm, TBST (Tris 2M 2.5ml, NaCl 5M 4ml, ph 8, tween 20 en 1/2000ml) junto con Metanol, papel whatman, el marcador de peso molecular Kaleidoscope (precisión plus protein standars kaleidoscope, sample from representative lot run on a 4-20% Tris-HCl gel, Bio-rad), anti cuerpo anti-MyoD (anti MyoD1 (D8 G3) XP Rabbit mAb, cell signaling 1:500), anti cuerpo anti-miogenina (anti Myogenin, Rat mAb, F5D, DSHB, Developmental Studies Hybridoma Bank, 2:500), anti TDP43 (Rabbit, 1:1000, Cell Signaling), anti FUS (Rabbit, 1:1000, Cell Signaling), anti SOD1 (Mouse, 2µg/ml, Invitrogen), anti beta tubulin (Rabbit, Mouse, 1:1000, 1:1000, Invitrogen).

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

1.5 Medición de ROS intracelular mediante DHE (dihidroxietilio). Para ello primero se tripsinizan las células y se resuspenden en 200µl de DPBS, glucosa 5mM, CaCl₂ 1mM, MgCl₂ 0.5mM y DHE 3.2µM. Se incuba 20

minutos a 37°C. Seguidamente, se analiza en el citómetro Guava, Millipore utilizando el láser de fluorescencia Red-Blue detectando 10000 células por muestra.

Se han utilizado 3 líneas de células humanas infectadas con lentivirus *small hairpin* RNA con un gen silenciado distinto en cada caso. Estos genes son: TDP43, SOD1 y FUS y el control de la infección ShRNA o Scramble.

Una vez silenciados estos genes se han puesto estas células en condiciones adecuadas para crecer y se ha observado su crecimiento a distintas confluencias.

2 Caracterización del proceso miogénico en las líneas celulares ShRNA, ShTDP43, ShFUS y ShSOD1.

2.1 Cultivo de las líneas celulares ShRNA, ShTDP43, ShFUS y ShSOD1 en el medio SGM (FBS 50ml, supplement mix, glutamax 6ml, gentamicina 500µl). Levantamiento de placas: tripsina al 0.05%, DPBS (Dulbecco's phosphate buffered saline, (-) CaCl₂, (-)MgCl₂, Gibco) y suero fetal bovino al 10%.

2.2 Diferenciación celular. Para ello se ha utilizado medio 1 (DMEM 49.4ml, Apotransferrina (10mg/ml) 500µl, insulina 50µl, gentamicina 50µl) cuando las placas con las células de mioblastos estaban a confluencia 100% y medio 2 (neurobasal A 48ml, B27 (50x) 1ml, glutamax (100x) 500µl, laminin (1mg/ml) 200µl, BDNF (10µg/ml) 100 µl, shh (25 µg/ml) 100 µl, NT3 (10 µg/ml) 100 µl, agrina (100 µg/ml) 50 µl, gentamicina 50 µl, CNTF (20 µg/ml) 12.5 µl, IGF1 (100 µg/ml) 5 µl) en el día 2 post-diferenciación.

2.3 Extracción de proteínas con *sample buffer* 4x (volumen total 8ml, tris 2M 1.25ml, glicerol 2ml, ph 7.5, SDS 25% 2.56ml, azul bromofenol 0.04g, 100µl de β-mercaptoetanol al 99%). Calentar el *buffer* a 100° durante 5 minutos.

2.4 Análisis de las proteínas mediante la técnica de *Western Blot*: Gel Mini Protean TGX Precast Gels, Bio Rad, 4-20%, 15-well comb, 15µl/well, el *Running Buffer* (Tris 3.03g, glicina 14.4g, SDS 1.5g, H₂O 0.1l), el Transfer Buffer (Tris 3.02g, glicina 14.4g, H₂O csp 0.1l), el *Blocking Solution* (goat milk 2.5g, TBST csp 50ml), la Membrana Immuno-Blot PVDF Membrane for protein blotting sample, Bio Rad, 7x8.5cm, 0.2µm, TBST (Tris 2M 2.5ml, NaCl 5M 4ml, ph 8, tween 20 en 1/2000ml) junto con Metanol, papel

whatman, el marcador de peso molecular Kaleidoscope (precisión plus protein standards kaleidoscope, sample from representative lot run on a 4-20% Tris-HCl gel, Bio-rad), anti cuerpo anti-MyoD (anti MyoD1 (D8 G3) XP Rabbit mAb, cell signaling 1:500), anti cuerpo anti-miogenina (anti Myogenin, Rat mAb, F5D, DSHB, Developmental Studies Hybridoma Bank, 2:500).

Los anticuerpos primarios y secundarios estarán disueltos en una solución de BSA que contiene BSA 0.05G/TBST, NaN_3 2 μl /TBST.

3 Inmunofluorescencia

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

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DEL PROCESO MIOGÉNICO EN LA LÍNEA 8220 DE MIOBLASTOS *WILD TYPE* Y CARACTERIZACIÓN DEL MISMO

4.1.1 Mioblastos en cultivo a diferentes confluencias y en los primeros días de diferenciación miogénica

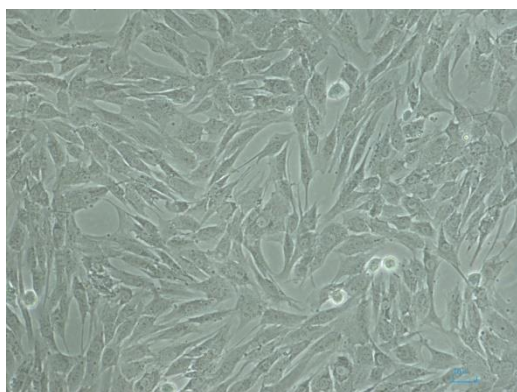


Figura 1. Células 8220 WT a confluencia 90%.

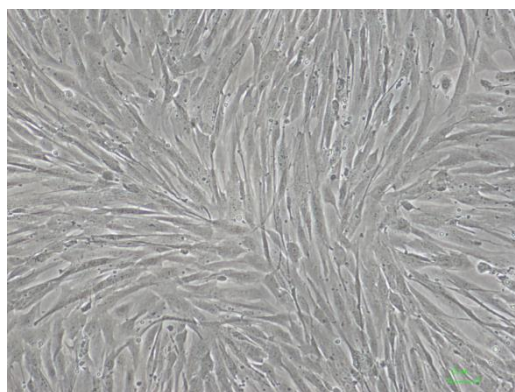


Figura 2. Células 8220 WT a confluencia 100%.

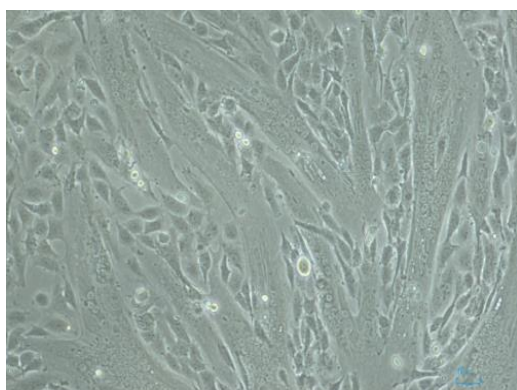


Figura 3. Células 8220 WT con medio 1, día 1 de diferenciación.

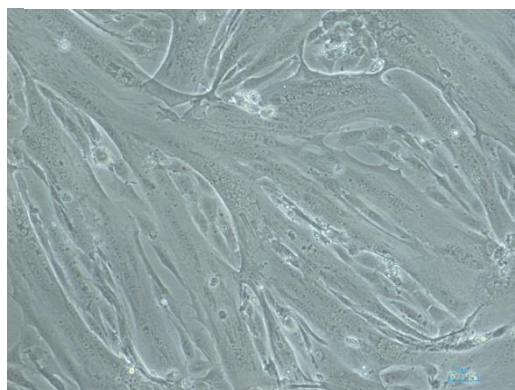


Figura 4. Células 8220 WT con medio 2, día 2 de diferenciación.

Los mioblastos a 90% de confluencia (Fig. 1) presentan una morfología uniforme de aspecto redondeado con un núcleo bien diferenciado. En la siguiente imagen, las células están al 100% de confluencia y presentan algunas prolongaciones que entran en contacto con las otras células, es entonces cuando se empiezan a secretar varias sustancias que activan la diferenciación a miotubos, en este estadio los mioblastos se han transformado en miocitos. Al 100% de confluencia se le añade medio 1 de

diferenciación (MD1) para activar la fusión de mioblastos. En el día 1, se observan los primeros miotubos con aspecto cilíndrico (Fig.3) y miocitos mononucleares. Al microscopio óptico se ve cómo los miotubos primarios tienen una cadena de núcleos múltiples centrales rodeados por varias estriaciones. En el día 2, se observan un gran número de miotubos de gran tamaño y multinucleados con los núcleos posicionándose en la periferia, signo de maduración progresiva.

Objetivo 1.2: Análisis de la expresión de proteínas miogénicas mediante la técnica de Western Blot.

4.1. 2 Expresión de la proteína MyoD a confluencias 90%, 100%, día 1 y día 2

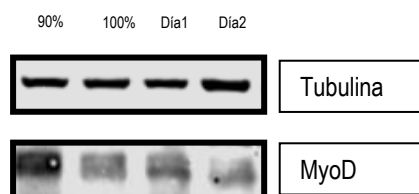


Figura 5. Western Blot de tubulina y proteína MyoD a confluencias 90%, 100%, día 1 y día 2.

La tubulina es una proteína endógena que se expresa sin cambios en todas las líneas celulares y en este caso se ha utilizado como normalizador de la cantidad de proteína que se ha cargado en el gel. En cuanto a la proteína MyoD, vemos como su pico de expresión se encuentra a confluencia 90%, es decir es una proteína cuya expresión máxima se alcanza durante la proliferación, y en cuanto avanza la diferenciación o proceso de miogénesis la expresión disminuye.

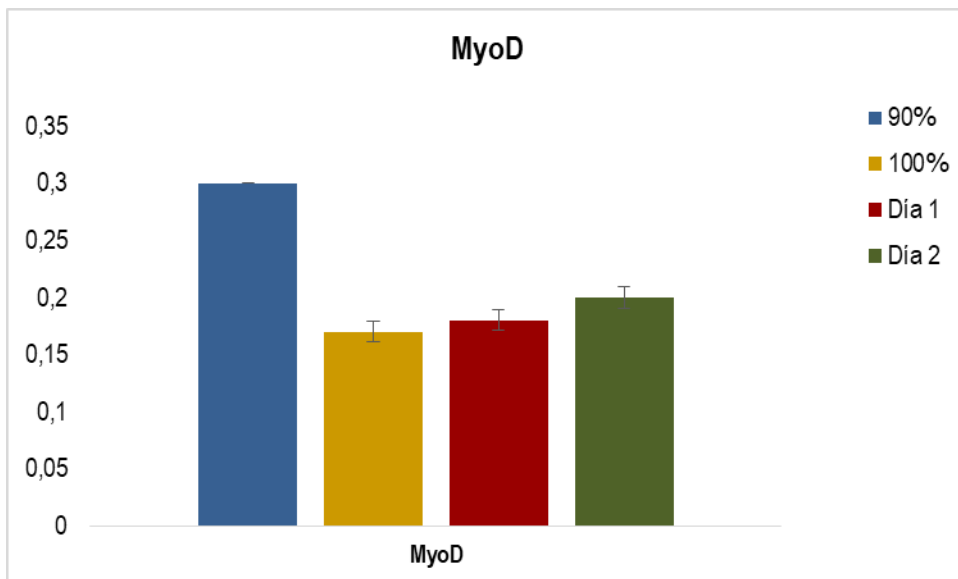


Figura 6. * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.001$. En esta gráfica se observa la cuantificación de la proteína MyoD en las confluencias 90%, 100%, día 1 y día 2. Se observa como su pico de expresión es a confluencia 90%.

4.1.3 Expresión de la proteína Miogenina a confluencias 90%, 100%, día 1 y día 2

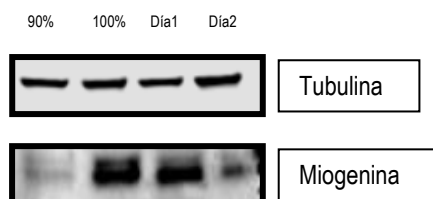


Figura 7. Western Blot de tubulina y proteína Miogenina a confluencias 90%, 100%, día 1 y día 2.

En este caso también utilizamos la tubulina como indicador de carga de proteína. A confluencia 100% y al día 1 de diferenciación, aumenta la expresión proteica de la miogenina y al día 2 disminuye.

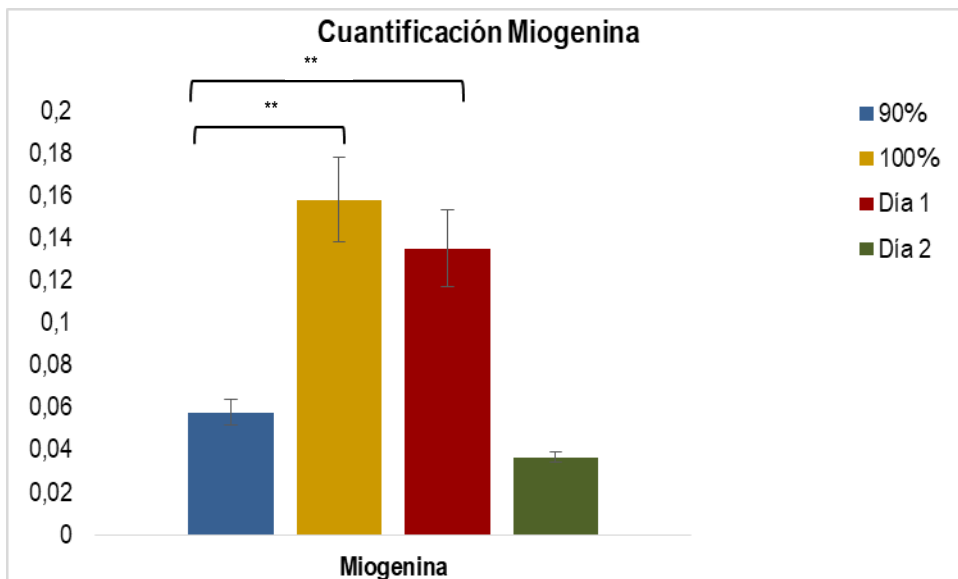


Figura 8. * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.001$. En esta gráfica se observa la cuantificación de la proteína Miogenina. Al analizarla, se ve como la expresión máxima de esta proteína estaría en la confluencia 100%, con una significancia del 0.005 ($p < 0.0012$) y al día 1 de diferenciación con una p de 0.002.

4.1.4 Expresión de las proteínas TDP43, FUS y SOD1 a confluencias 90%, 100%, día 1 y día 2

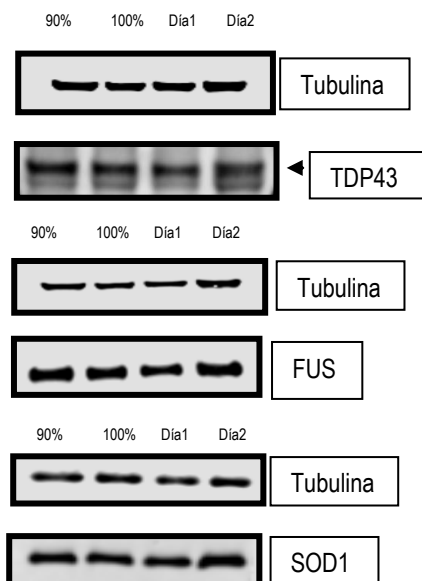


Figura 9. *Western Blot* de de las proteínas TDP43, FUS y SOD1 a confluencias 90%, 100%, día 1 y día 2.

Mediante la técnica de *Western Blot* se observa que no modifican la expresión de TDP43, FUS y SOD1 a lo largo del proceso de la miogénesis con lo cual no estarían regulando directamente el proceso de la regeneración muscular.

4.1.5 Medición de ROS intracelular

Para verificar que la expresión de SOD1 no cambia con el tiempo, se han medido los niveles de ROS en las mismas células mediante la medición de ROS a través de DHE (dihidroxietidio). Éste es oxidado por ROS y emite fluorescencia a una longitud de onda de 605nm de emisión. Con esto podemos ver en la figura 10 que los niveles de ROS no cambian a lo largo del tiempo, lo cual explica los niveles de expresión de SOD1 constantes durante la miogénesis en la línea 8220.

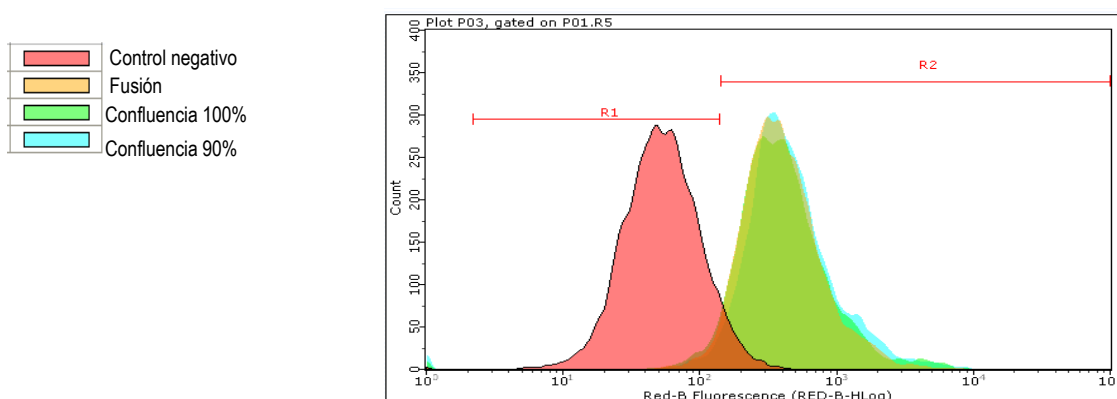


Figura 10. Medición de ROS a través de DHE (dihidroxietilio). Los niveles de ROS no cambian en el tiempo.

4.2 ESTUDIO DEL PROCESO MIOGÉNICO EN LAS LÍNEAS CELULARES SHRNA, FUS, TDP43 Y SOD1 Y CARACTERIZACIÓN DE LOS MISMOS

4.2.1 Mioblastos silenciados en cultivo a diferentes confluencias y en primeros días de diferenciación miogénica

4.2.1.1 Confluencia 90%

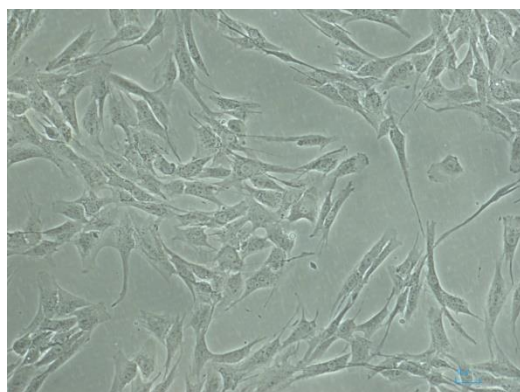


Figura 11. ShRNA.



Figura 12. ShFUS.

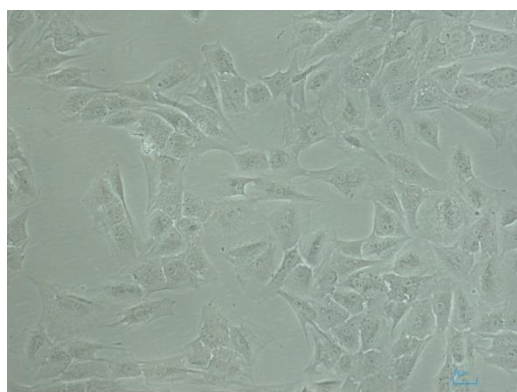


Figura 13. ShTDP.

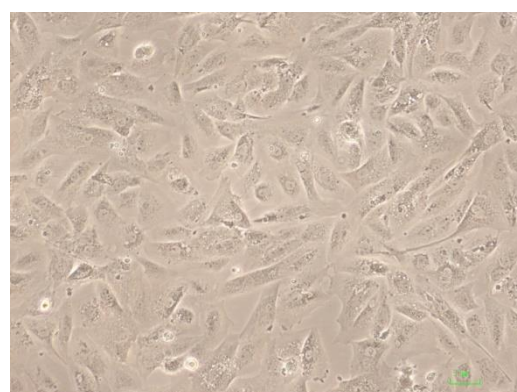
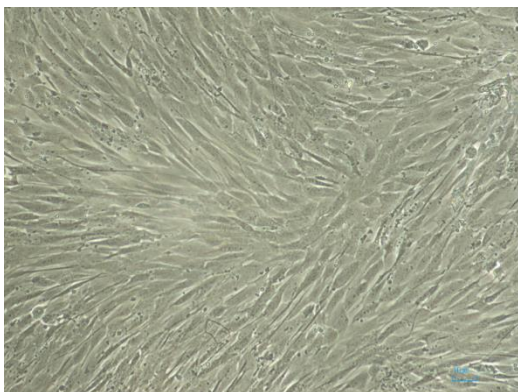
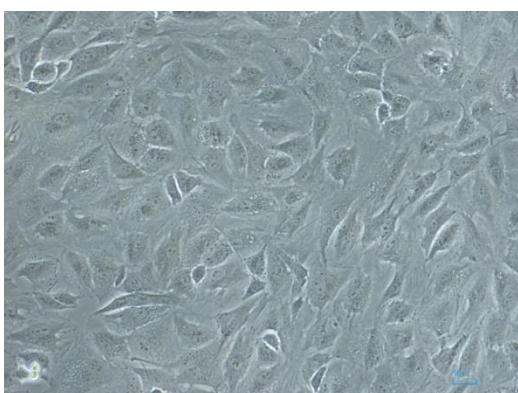
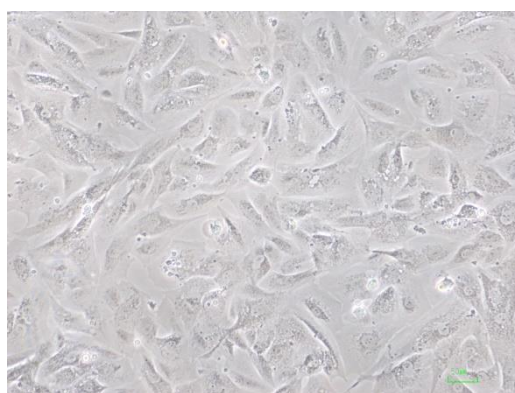


Figura 14. ShSOD1.

Se aprecia la diferente morfología de estas células en cada una de las líneas celulares estudiadas. Así como las células ShRNA son de menor tamaño que el resto, la línea ShFUS tiene una morfología peculiar tipo fusiforme. Un aspecto destacable de la línea ShTDP43 es el gran tamaño del núcleo, al igual que en SOD1, pero con un núcleo grande que presenta unos nucléolos muy marcados. La morfología de FUS es diferente con un aspecto fusiforme que recuerda a los fibroblastos.

4.2.1.2 Confluencia 100%

**Figura 15. ShRNA.****Figura 16. ShFUS.****Figura 17. ShTDP.****Figura 18. ShSOD1.**

Por un lado se observa como en el caso de la línea celular control ShRNA, el número de células es mayor que en las líneas FUS y TDP43. La causa podría estar en el aumento de tamaño de las células silenciadas que ocupan el mismo espacio con menos células o en que la proliferación celular esté afectada.

4.2.1.3 Día 0-1 post diferenciación

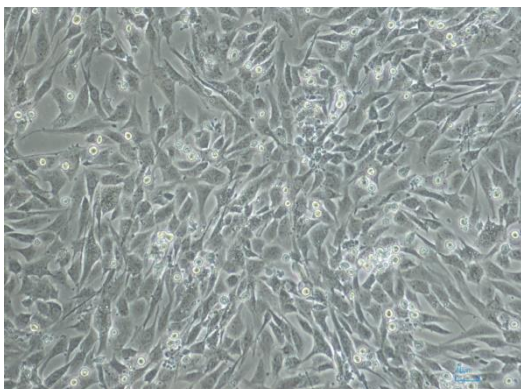


Figura 19. ShRNA.

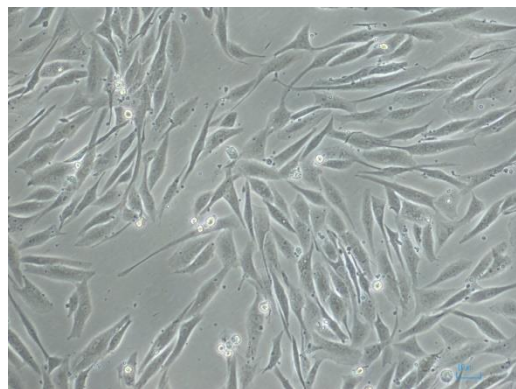


Figura 20. ShFUS.

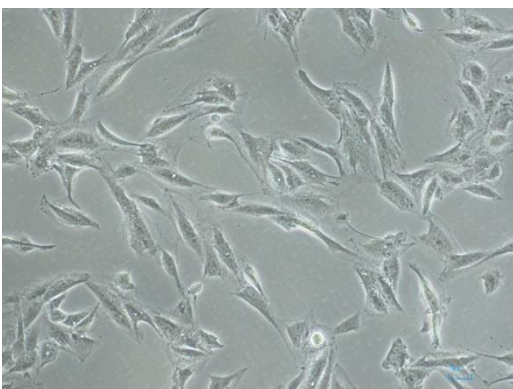


Figura 21. ShTDP43.

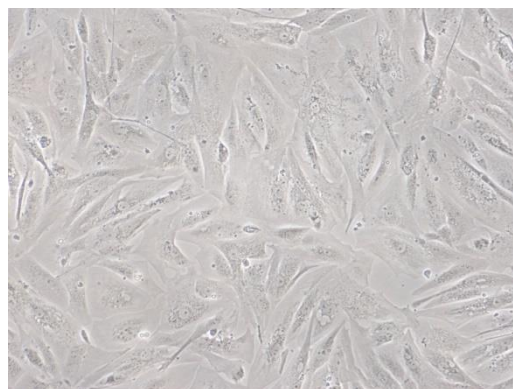
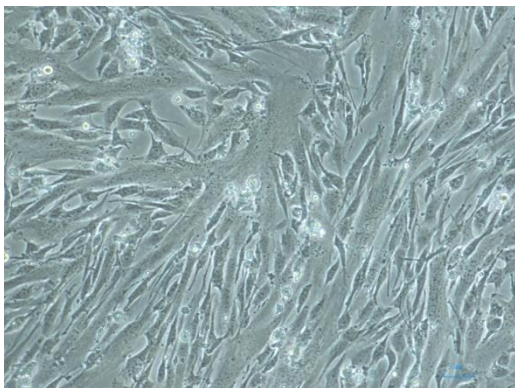
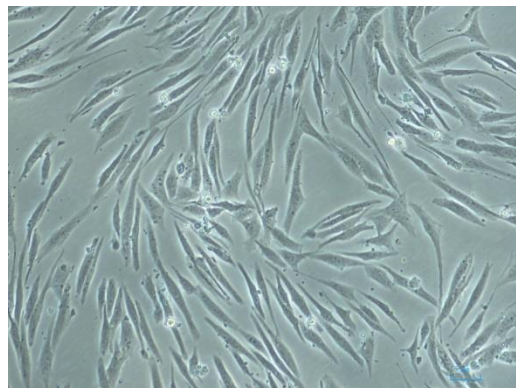
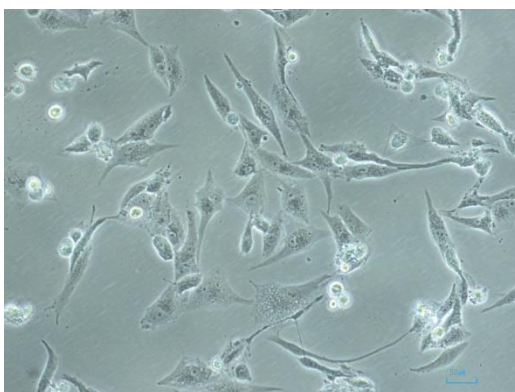
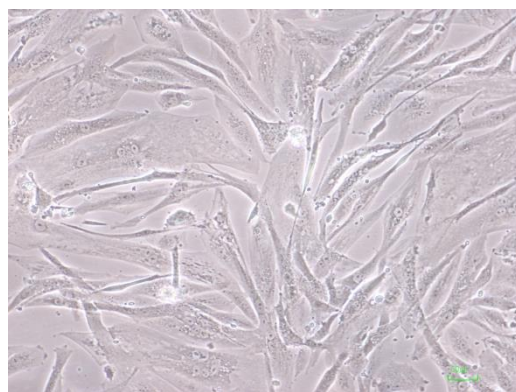


Figura 22. ShSOD1.

En el día 0 y 1 post diferenciación, comienzan a aparecer detritus celulares debido al propio proceso de diferenciación. Las líneas ShTDP43 y ShFUS comienzan a perder confluencia. Sin embargo, la línea ShTDP43 adquiere una morfología tipo miocito, propia al proceso de diferenciación. Se observa como las líneas celulares ShRNA y SOD1 sí diferencian pero no las líneas FUS y TDP43. En las primeras dos líneas nombradas se observan algunas células multinucleadas.

4.2.1.4 Día 2 post diferenciación

**Figura 23.** ShRNA.**Figura 24.** ShFUS.**Figura 25.** ShTDP43.**Figura 26.** ShSOD1.

En el día 2 post diferenciación, las células ya llevan 3 días con MD1, el cual tiene factores que promueven la miogénesis y esta debería verse. No obstante, solo la vemos en el caso de la línea celular ShRNA. En las líneas FUS y TDP43 no se da este proceso y en caso de SOD1, pese a que se aprecien células multinucleadas, no presentan la morfología propia del miotubo y recuerda a una morfología sincitial, por lo que el proceso miogénico no estaría en sus parámetros normales.

4.2.2 Caracterización de la miogénesis por líneas celulares

4.2.2.1 ShRNA

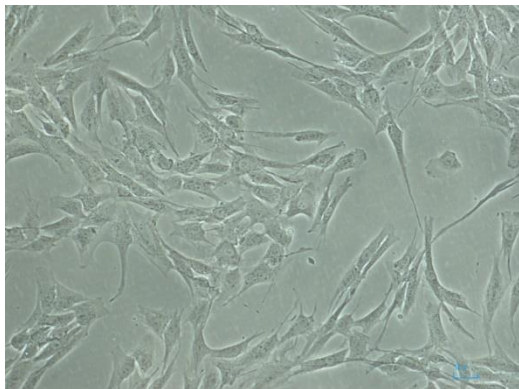


Figura 27. Células ShRNA a confluencia 90%.

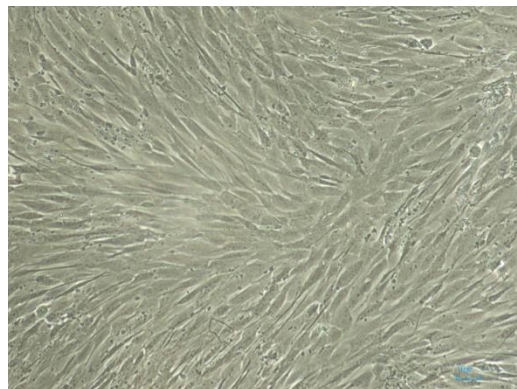


Figura 28. Células ShRNA a confluencia 100%.

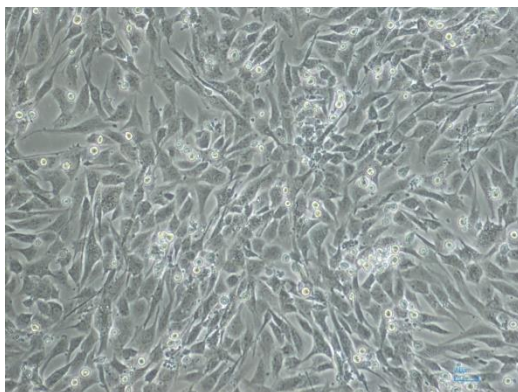


Figura 29. Células ShRNA con medio 1, día 0 de diferenciación.

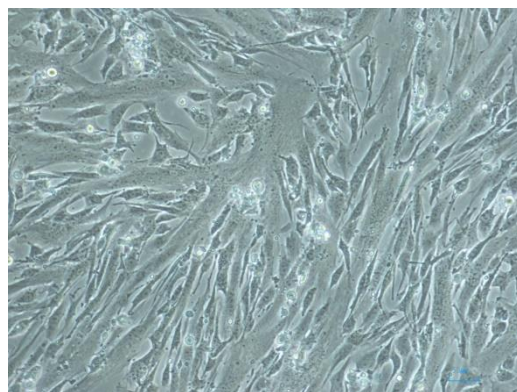


Figura 30. Células ShRNA con medio 1, día 2 de diferenciación.

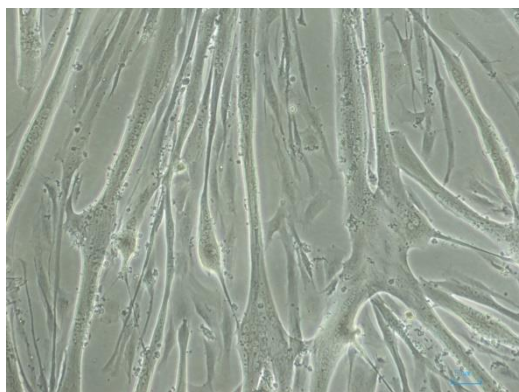


Figura 31. Células ShRNA al día 4 post diferenciación.

En la línea celular ShRNA se observa un proceso miogénico similar al de la línea celular 8220 *WT* con lo que el método de silenciamiento lentiviral, por el que se obtienen las líneas silenciadas, no afecta a la diferenciación celular. Se ven mioblastos

a confluencias 90% y 100% y una vez añadido el medio 1 se empieza a observar la formación de miotubos, lo que hace deducir que el proceso de la miogénesis se está llevando a cabo. A los días 2 y 4 post diferenciación, se ven algunos miotubos y comienza a verse un halo de refringencia alrededor de cada miotubo, un marcador de maduración celular. Al día 4, se observa cómo algunos de estos miotubos ya tienen los núcleos situados en la periferia y su organización recuerda a la de una fibra muscular.

Debido a la rotura de membranas en el proceso de fusión, se observan fragmentos apoptóticos en el medio extracelular propios del proceso de fusión celular.

4.2.2.2 FUS

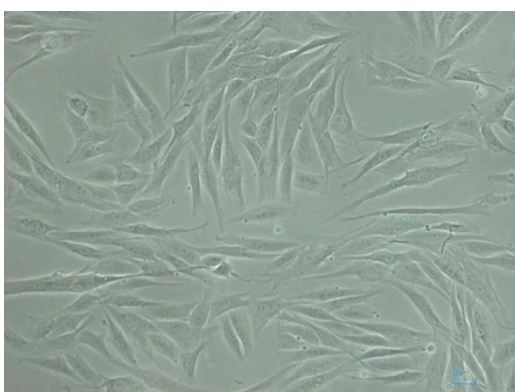


Figura 32. Células FUS a confluencia 90%.

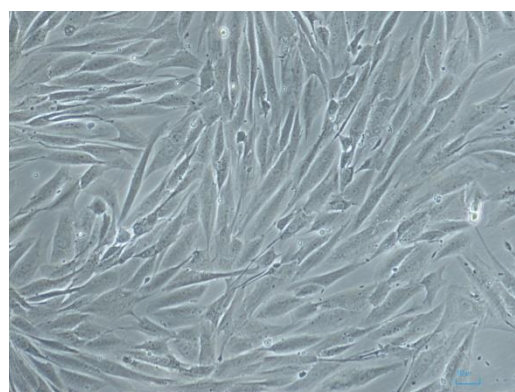


Figura 33. Células FUS a confluencia 100%.

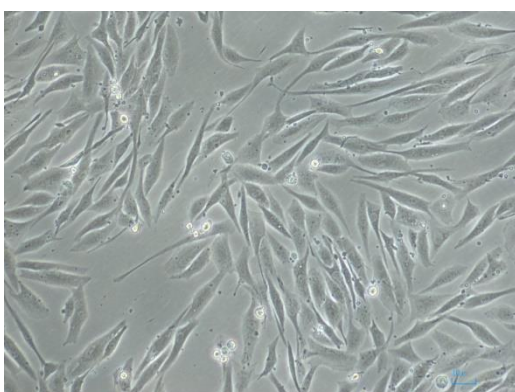


Figura 34. Células FUS con medio 1, día 0 de diferenciación.

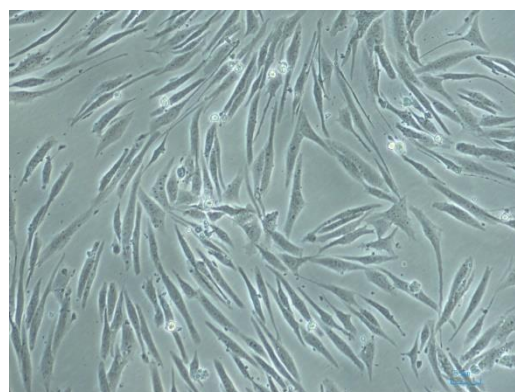


Figura 35. Células FUS con medio 1, día 2 de diferenciación.



Figura 36. Células FUS al día 4 post diferenciación.

En esta línea celular se observa que desde el principio, desde confluencia 90%, los mioblastos morfológicamente son algo distintos en comparación con los de las líneas celulares 8220 *WT* y *ShRNA*. En este caso, estas células indiferenciadas son algo más fusiformes recordando a la estructura de un fibroblasto. Una vez puesto el medio de diferenciación, al día 1 post diferenciación, no se observa ningún miotubo. Además, han perdido la confluencia. Con lo que estas células no son capaces de activar la diferenciación celular que se manifiesta con posible la activación apoptótica. A los días 2 y 4 post diferenciación no se ve ningún miotubo y se observa una clara pérdida de confluencia, consecuencia de la apoptosis de las células por falta de sustancias tróficas que mantienen al mioblasto indiferenciado.

4.2.2.3 TDP43

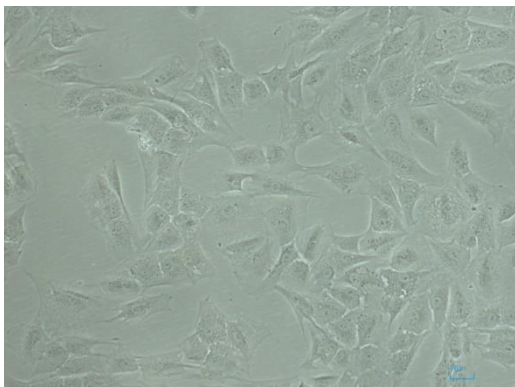


Figura 37. Células TDP a confluencia 90%.

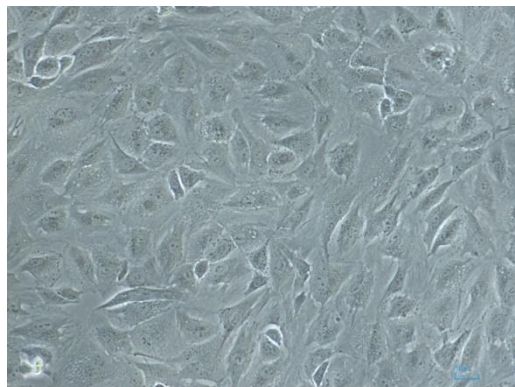


Figura 38. Células TDP a confluencia 100%.

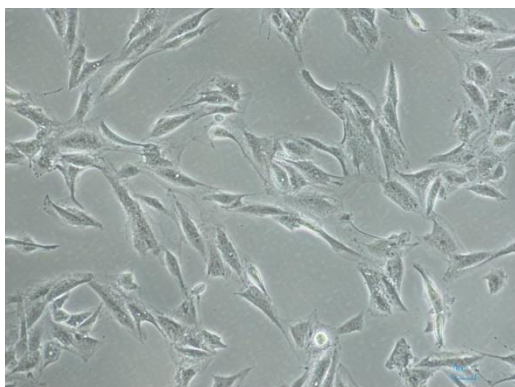


Figura 39. Células TDP43 con medio 1, día 0 de diferenciación.

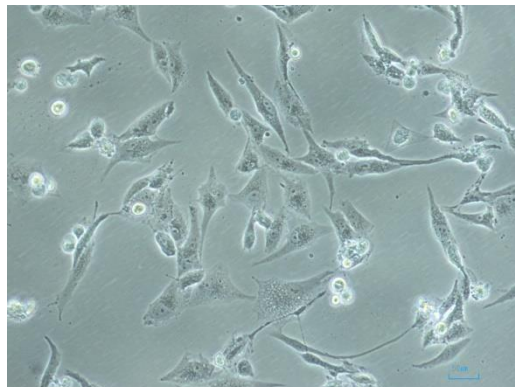


Figura 40. Células TDP43 con medio 1, día 2 de diferenciación.

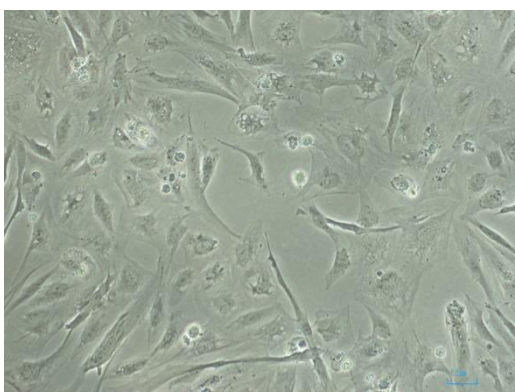


Figura 41. Células TDP43 al día 4 post diferenciación.

En el caso de la línea celular de TDP43, se observa una diferencia evidente desde la morfología de los mioblastos (a confluencia 90%) si se compara con la de las líneas celulares 8220 *WT* y *ShRNA*. Los mioblastos de esta línea son más redondeados y grandes, con un núcleo prominente en el que se pueden observar claramente los

nucléolos. En el día 1 de diferenciación, en el que hemos añadido previamente MD 1, podemos observar la ausencia de fusión además de una pérdida de confluencia. Sí que se observa un cambio de la morfología de la célula, ésta tiende más a parecerse a la morfología del miocito (célula previa en el proceso de fusión). Esto, ocurre debido a la ausencia de factores de crecimiento que tiene el MD1 y a la presencia de reactivos de diferenciación; lo que implica que la proliferación se pare. En este momento, en condiciones fisiológicas se activaría la miogénesis. Sin embargo, en las TDP43, no se observa ningún evento de fusión. En cambio, se ve muerte celular. A los días 2 y 4 post diferenciación, no se ve ningún miotubo y se observa una clara pérdida de confluencia, consecuencia de la apoptosis de las células por falta de sustancias tróficas que sustenten su vida como mioblasto indiferenciado.

4.2.2.4 SOD1

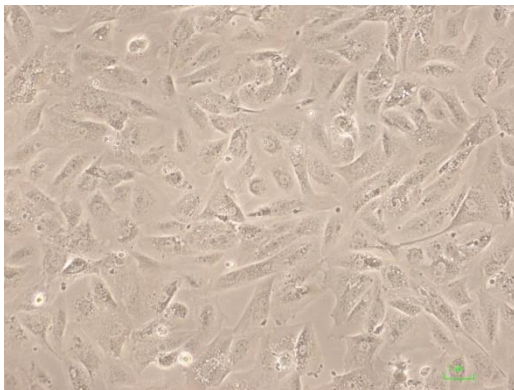


Figura 42. Células SOD1 a confluencia 90%.

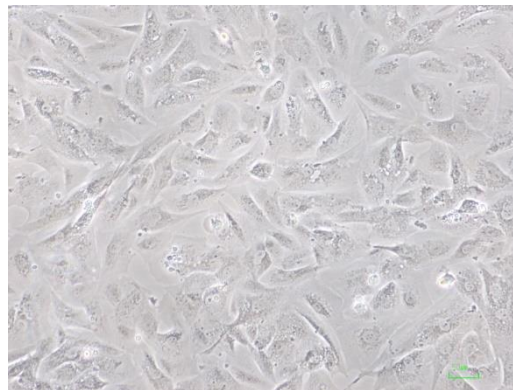


Figura 43. Células SOD1 a confluencia 100%.

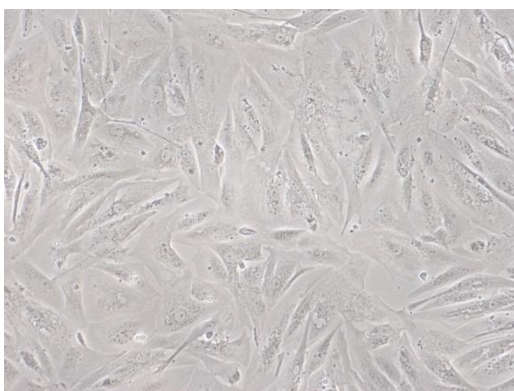


Figura 44. Células SOD1 con medio 1, día 1 de diferenciación.

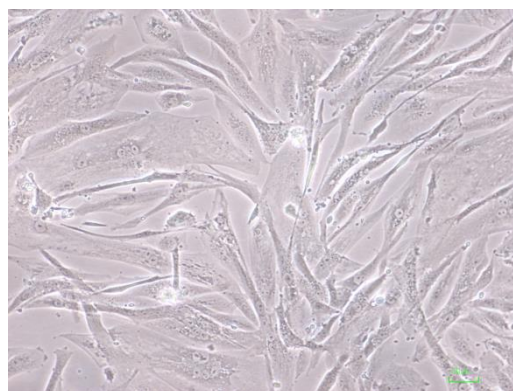


Figura 45. Células SOD1 con medio 2, día 2 de diferenciación.

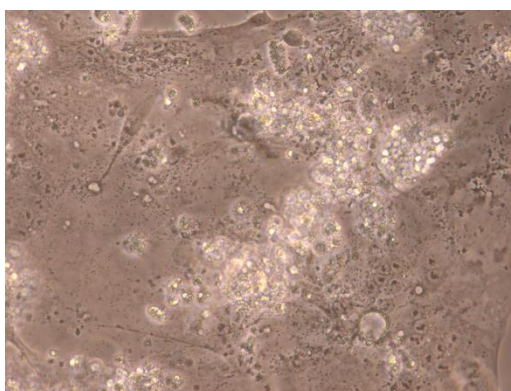


Figura 46. Células SOD1 con medio 2, día 4 de diferenciación.

Al analizar esta línea celular se observa como a confluencia 90% los mioblastos son distintos a los de las líneas celulares 8220 WT y ShRNA. Este caso, los mioblastos son más redondos y grandes. Al día 1 de diferenciación, empieza a cambiar la morfología de las células y se observa algo de fusión, apareciendo miotubos

binucleares. Al día 2 de diferenciación, se ven pequeños sincitios, fusión de varias células uninucleadas, con reabsorción de las membranas correspondientes. Esto se debe, a que aunque se dé el proceso de diferenciación hay alguna alteración en la miogénesis. Se puede ver que morfología de los miotubos es anormalmente sincitial lo que sugiere que el proceso miogénico está alterado.

4.2.3 Análisis de las proteínas promiogénicas MyoD y Miogenina mediante la técnica de *Western Blot*

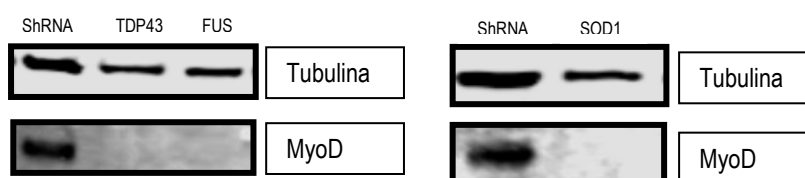


Figura 47. *Western Blot* de de la proteína MyoD a confluencia 90% en las líneas celulares ShRNA, TDP43, FUS y SOD1.

Estas imágenes corresponden a la confluencia 90%, ya que en situación fisiológica es cuando mayor es la expresión de MyoD. Como se puede observar en la línea celular ShRNA, esta proteína sí que se expresa, como en el caso de la línea celular WT, a esta confluencia. No obstante, en las líneas celulares TDP43 y FUS no se ve nada, es decir, no hay proteína que se pueda cuantificar, la proteína MyoD no está presente en estas líneas.

También tenemos la línea celular de SOD1. En este caso, como en las líneas celulares TDP43 y FUS, vemos como no hay proteína MyoD que se pueda cuantificar.

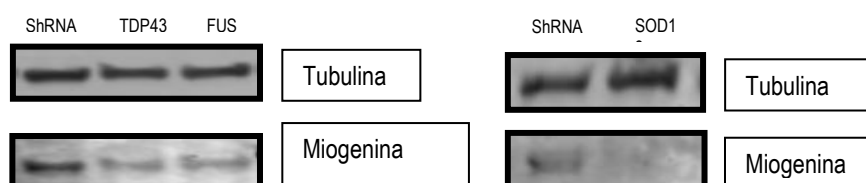


Figura 48. *Western Blot* de de la proteína Miogenina a confluencia 100% en las líneas celulares ShRNA, TDP43, FUS y SOD1.

Estas imágenes corresponden a la confluencia 100%, porque en una situación fisiológica es entonces cuando más miogenina se expresa, ya que es una proteína tardía de la diferenciación. Al observar la miogenina, se ve que su expresión es mínima tanto en TDP43 como en FUS. En cuanto a la línea SOD 1, observamos que ocurre lo mismo.

En otros *Western Blot* realizados, la bajada de TDP43 ha sido más acusada pero se ha decidido poner esta imagen porque visualmente se aprecia mejor.

4.2.4 Análisis de proteínas presentes en el miotubo características del proceso de miogénesis

La miogenina es una proteína imprescindible para que se lleve a cabo la diferenciación del músculo. Esta proteína es al mismo tiempo importante para que se expresen otras muchas proteínas que son características del miotubo y por ende, de una correcta regeneración muscular: la calstabilina, troponina, α actinina y miosina son algunas de ellas.

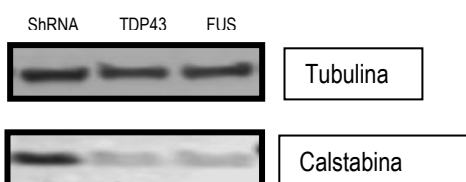


Figura 49. *Western Blot* de de la proteína Calstabilina.

La calstabilina es una proteína que se une a la rianodina del retículo sarcoplásmico (E.R) para estabilizarla y no dejar salir el calcio del E.R.

Como se puede ver, su expresión en las líneas celulares de TDP43 y FUS es mínima en comparación con la de ShRNA.

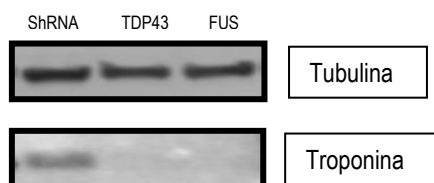


Figura 50. *Western Blot* de de la proteína Troponina.

La troponina es proteína presente en el miocito en concentraciones elevadas por ello se encuentra en el músculo estriado y músculo cardíaco. La troponina es el complejo proteínico regulador de la función contráctil del músculo estriado.

En esta imagen se ve como la troponina no se expresa en la línea celular TDP43 y tampoco en la de FUS pero en cambio sí en la línea celular ShRNA. Lo que indica ausencia de esta proteína fundamental del miocito en estas dos líneas celulares. Como consecuencia, no hay miocitos y es por ello que no se puede generar músculo cuando se silencian TDP43 o FUS.

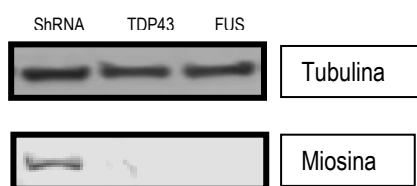


Figura 51. *Western Blot* de de la proteína Miosina.

La miosina es la proteína ATPasa más abundante del músculo esquelético. Es una proteína fibrosa y junto con la actina permite la contracción muscular. Como ocurre con la troponina, en este caso también se observa como no se expresa en las líneas celulares TDP43 y FUS pero sí en ShRNA. En esta última línea celular sí que habrá miocitos, músculo, pero en las dos primeras no.

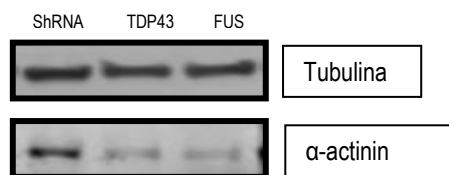


Figura 52. *Western Blot* de de la proteína α-actinina.

La αactina es una proteína de unión a actina especialmente abundante en los sarcómeros del músculo esquelético. En este caso también vemos como se expresa en la línea celular SHRNA pero no en TDP43 y FUS.

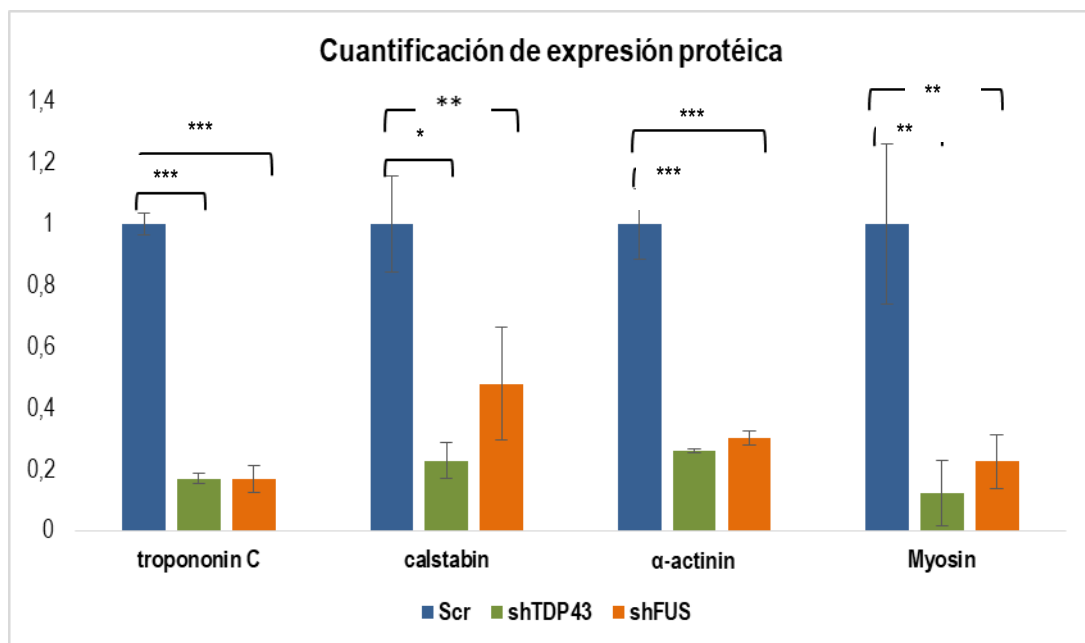


Figura 53. * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.001$. En cuanto a la troponina, se ve que hay una diferencia muy significativa entre las líneas celulares ShRNA y TDP43, y ShRNA y FUS; ésta se expresa en la línea ShRNA pero no en las otras dos. En el caso de Calstabin, no hay diferencia significativa con respecto a FUS estrictamente hablando, el parámetro p es algo mayor en este caso, 0.07, que 0.05 que es lo mínimo que se acepta en la ciencia; pero sí que hay una diferencia significativa con respecto a TDP43. Al analizar la α actinina, como en el caso de la Troponina, se ve que hay una diferencia muy significativa tanto en las líneas TDP43 como en FUS. Por último, con la Miosina también se ve que hay una diferencia significativa en las líneas TDP43 y FUS.

4.3 ANÁLISIS MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA DE LAS PROTEÍNAS MYOD Y MIOGENINA

4.3.1 MyoD

4.3.1.1 10x

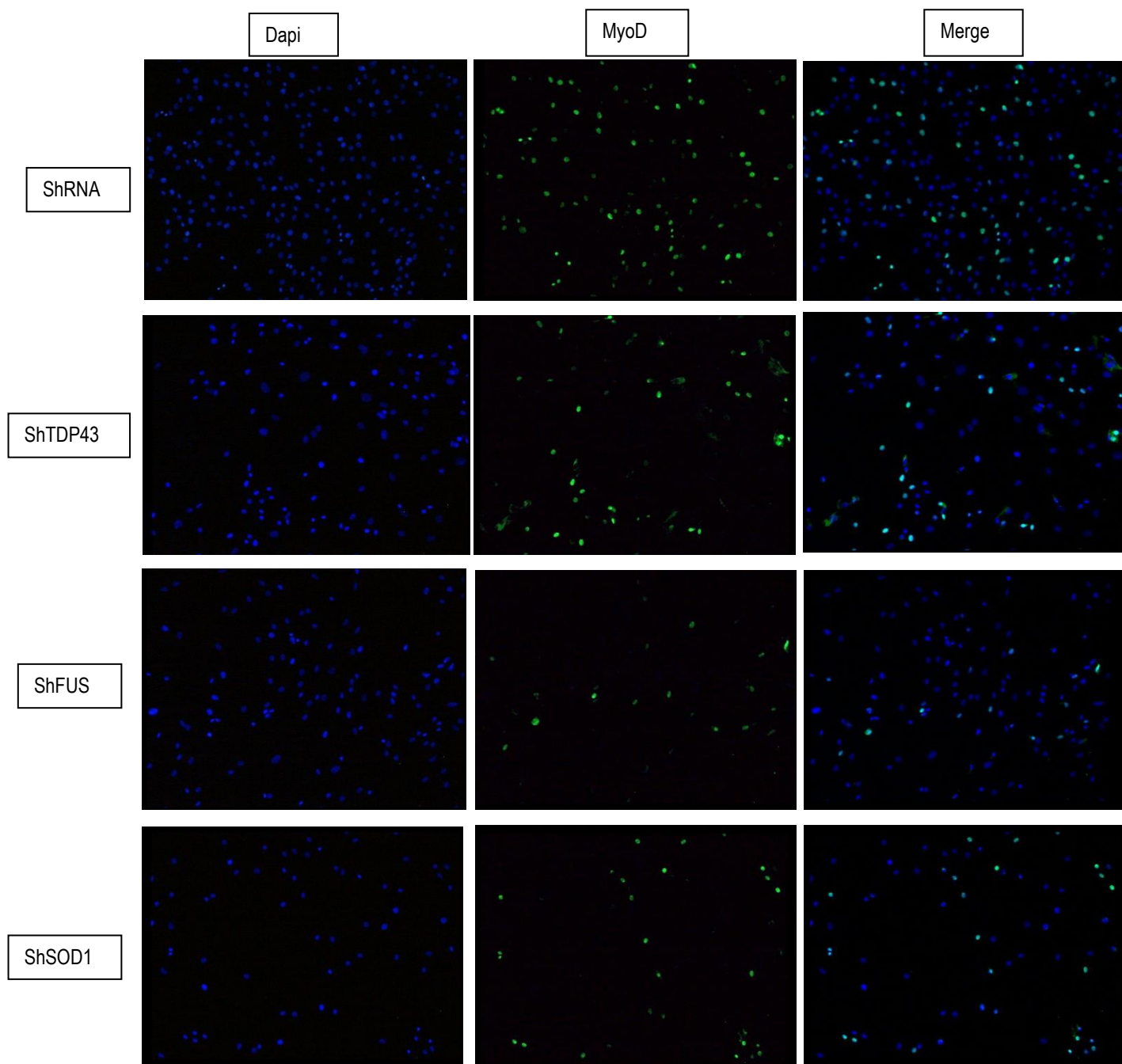


Figura 54. Inmunofluorescencia de la proteína MyoD a tamaño 10x.

4.3.1.2 20x

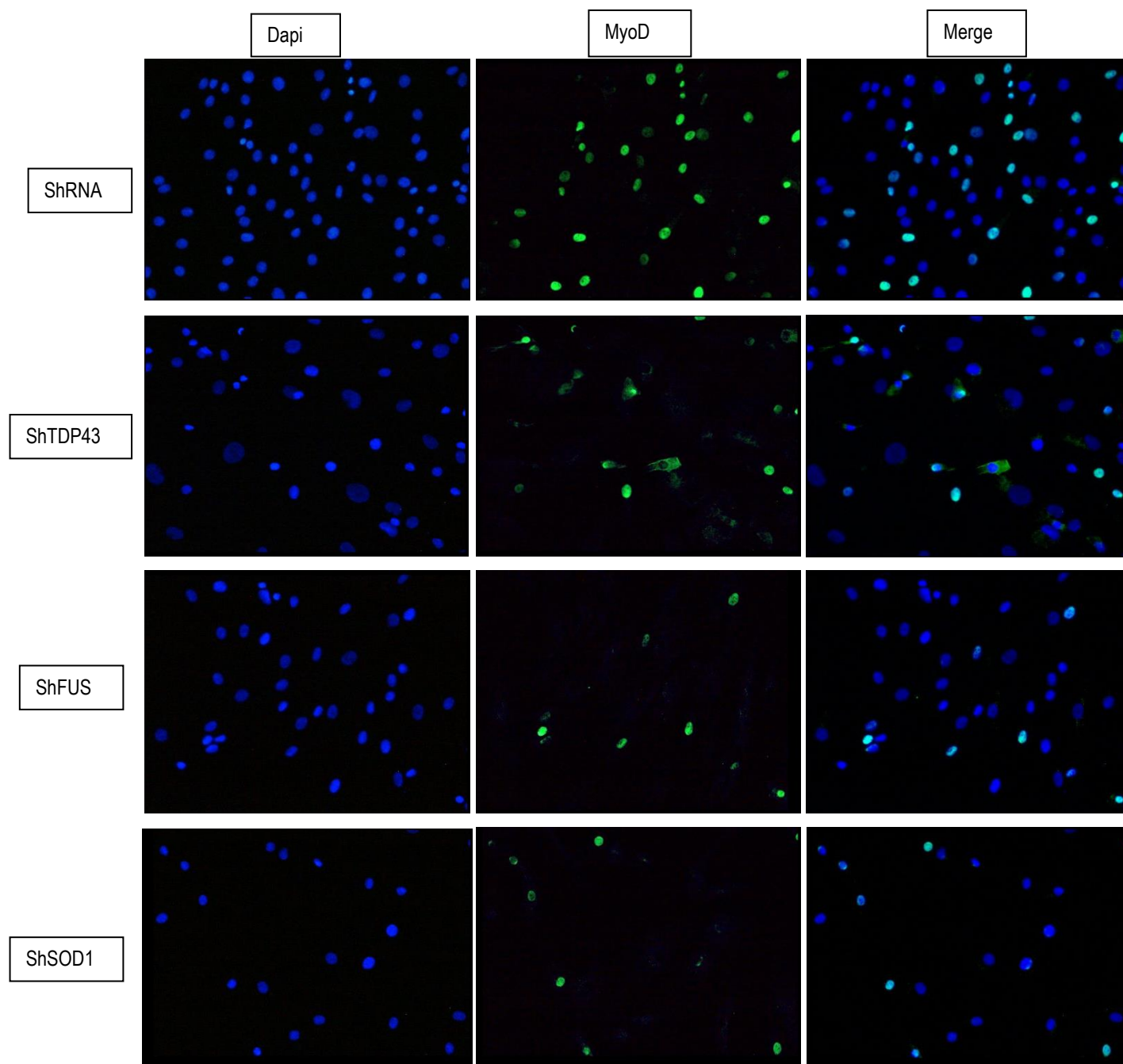


Figura 55. Inmunofluorescencia de la proteína MyoD a tamaño 20x.

4.3.1.3 40x

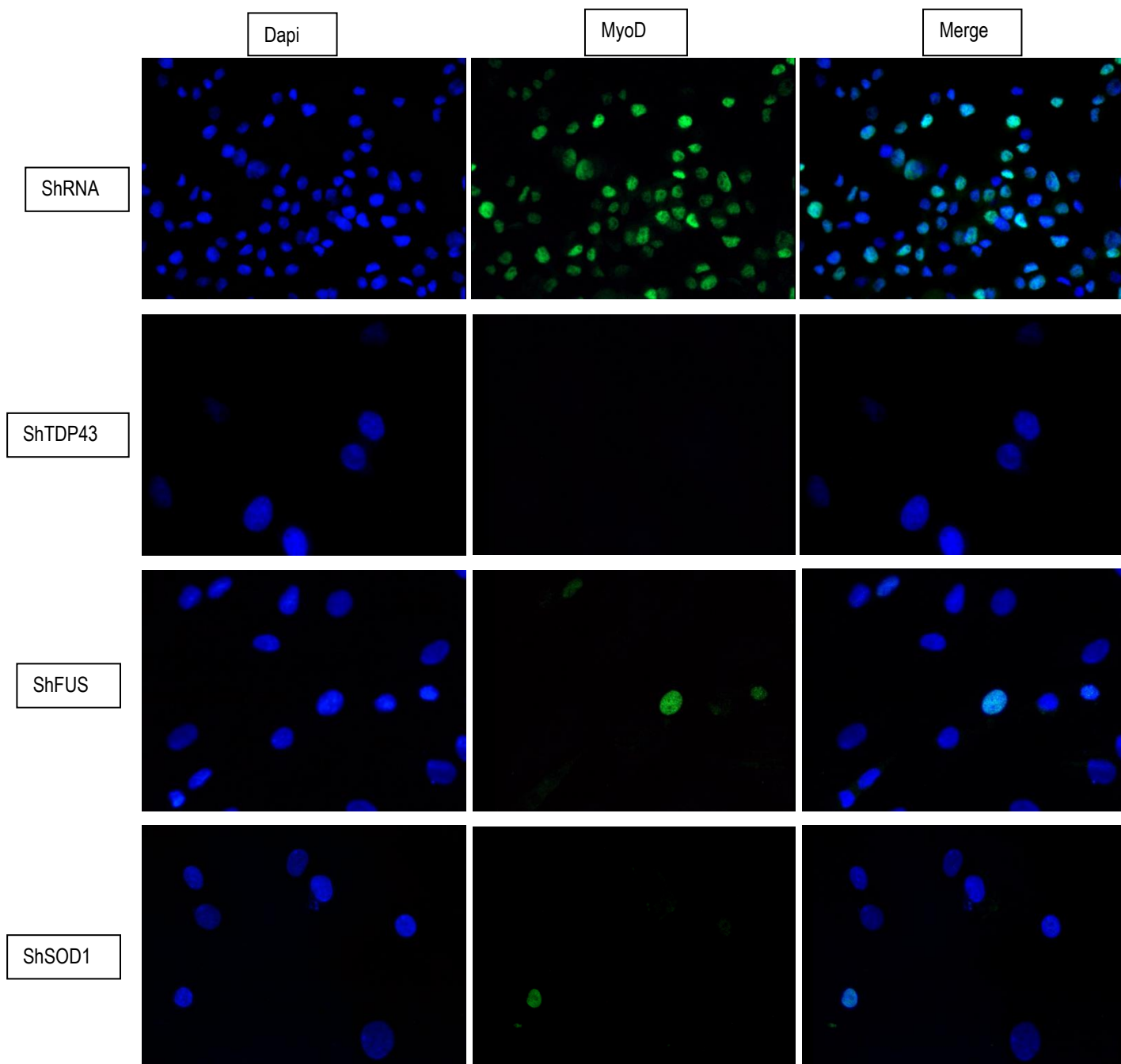


Figura 56. Inmunofluorescencia de la proteína MyoD a tamaño 40x.

Mediante esta técnica de inmunofluorescencia se observa la expresión de la proteína MyoD, proteína de expresión nuclear, en las distintas líneas celulares: ShRNA, ShTDP43, ShFUS y ShSOD1. Las imágenes “Dapi” representan los núcleos de las células, las imágenes “MyoD” representan la tinción de esta proteína y por último las imágenes “Merge” son un solapamiento de ambas imágenes.

En la línea ShRNA se ve como en la imagen “Dapi” (azul) hay una importante captación nuclear y además, en la segunda imagen de MyoD (verde), también es evidente como esta proteína queda marcada considerablemente. Por último, en la imagen “Merge”, observamos como la captación de la proteína MyoD corresponde a una captación nuclear.

En cuanto a la línea celular ShTDP43, se observa como esta técnica tiñe los núcleos pero en este caso, no se ve proteína MyoD marcada en el campo 40x. En los campos 10x y 20x en cambio sí que se ve alguna captación pero menos que en la línea ShRNA.

En las líneas celulares ShFUS y Sh SOD1 hay un leve marcaje de la proteína MyoD.

4.3.2 Miogenina

4.3.2.1 20x

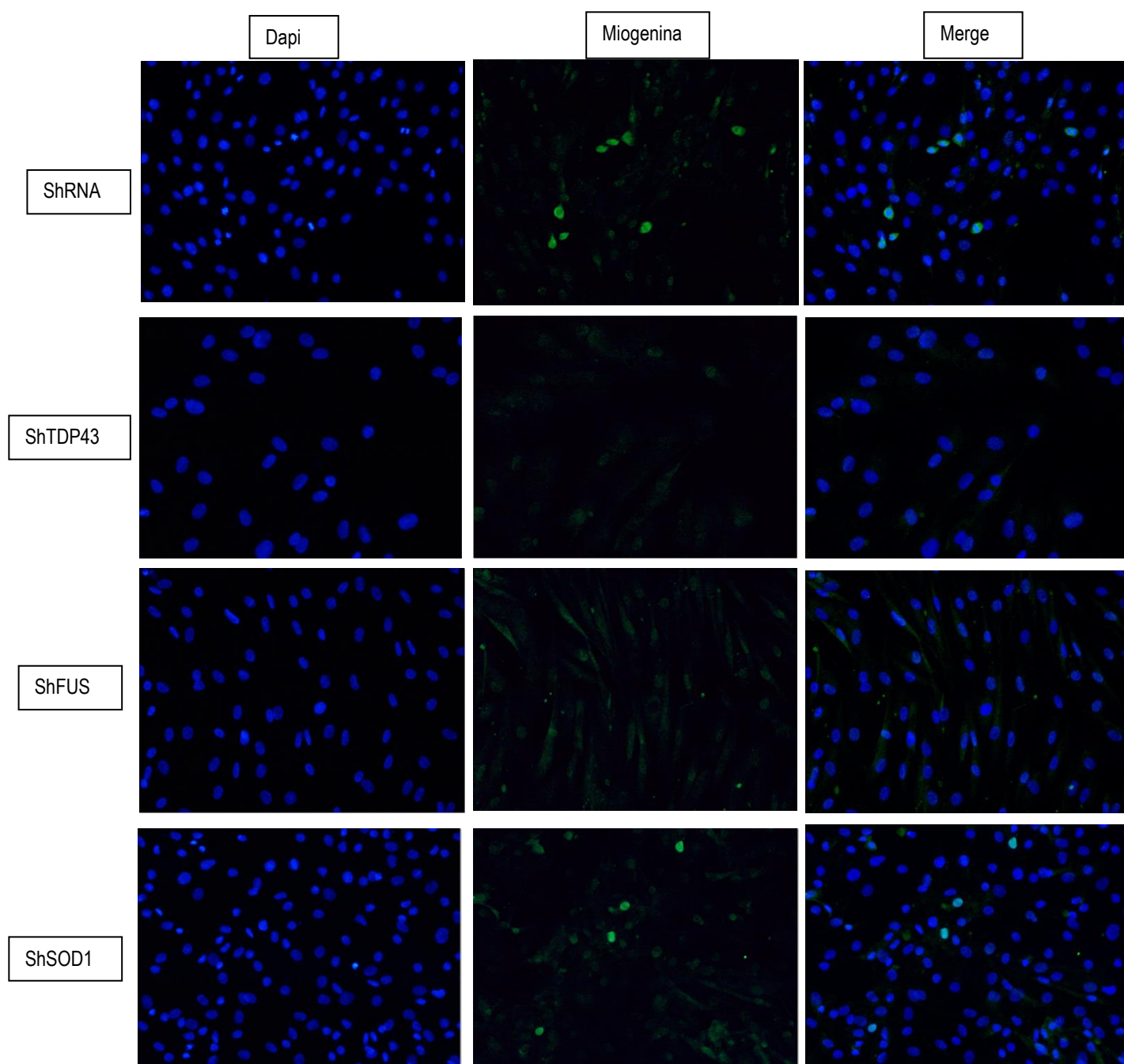


Figura 57. Inmunofluorescencia de la proteína Miogenina a tamaño 20x.

4.3.2.2 40x

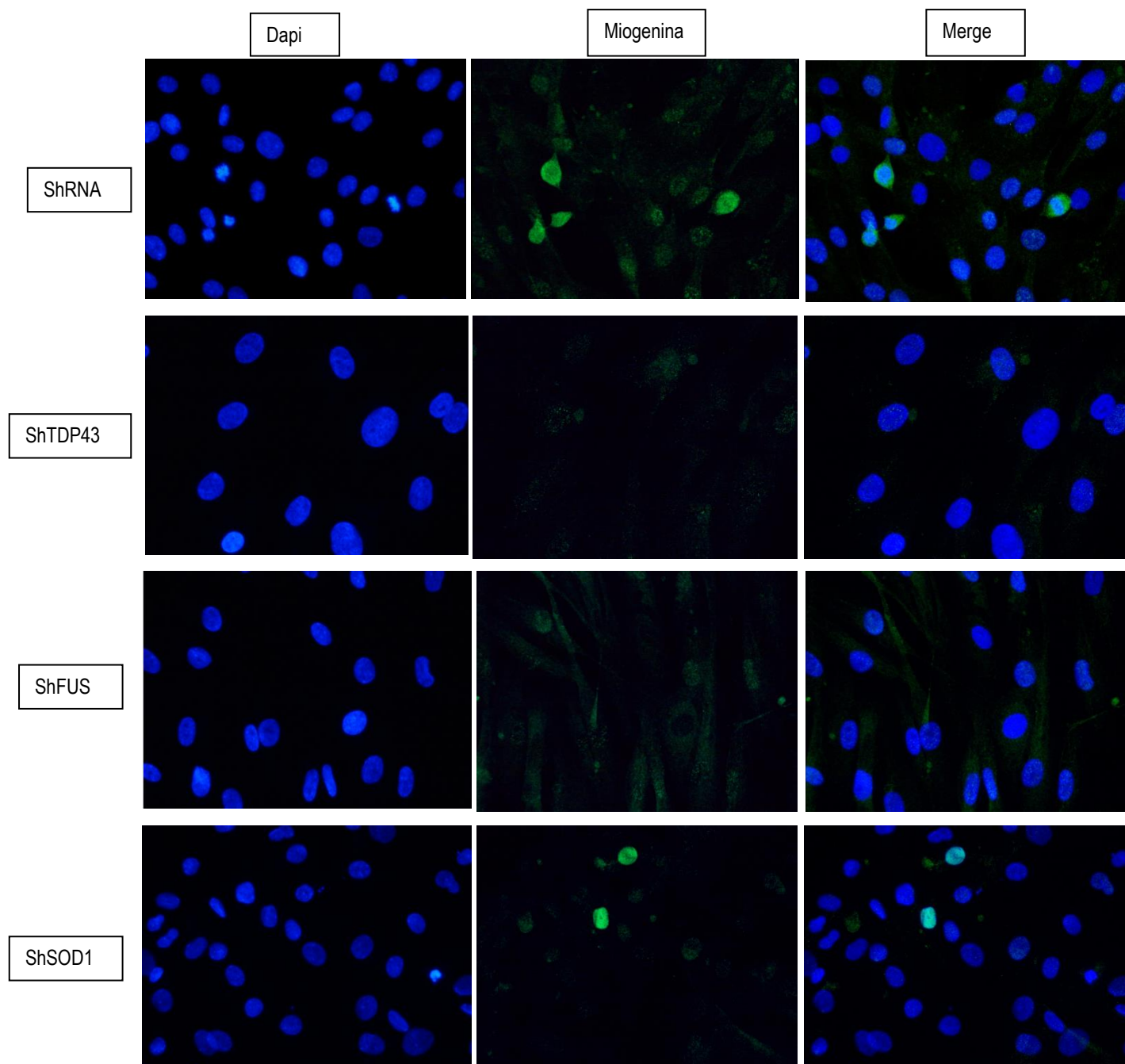


Figura 58. Inmunofluorescencia de la proteína Miogenina a tamaño 40x

Mediante esta técnica de inmunofluorescencia se observa la expresión de la proteína Miogenina, proteína de expresión nuclear, en las distintas líneas celulares: ShRNA, ShTDP43, ShFUS y ShSOD1. Las imágenes “Dapi” representan los núcleos de las células, las imágenes “Miogenina” representan la tinción de esta proteína nuclear y por último las imágenes “Merge” son un solapamiento de ambas imágenes.

En la línea ShRNA se ve como en la imagen “Dapi” (azul) hay una importante captación nuclear y además, en la segunda imagen, de Miogenina (verde), también es evidente como esta proteína queda marcada considerablemente. Por último, en la imagen “Merge”, observamos como la captación de la proteína Miogenina corresponde a una captación nuclear.

En las líneas celulares ShTDP43, ShFUS y ShSOD1 observamos un leve marcaje de proteína Miogenina, el cual es algo más evidente en el caso de la línea celular ShSOD1. En cambio en la línea celular ShRNA, se observa una clara captación de la proteína Miogenina.

5. DISCUSIÓN

La Esclerosis Lateral Amiotrófica es una enfermedad neurodegenerativa que presenta diferentes fenotipos en función de la afectación topográfica de las neuronas motoras. En estadios avanzados, la afectación es difusa y aparecen síntomas de primera y segunda motoneurona como la hiperreflexia, espasticidad, debilidad progresiva, fasciculaciones y atrofia de los cordones laterales de la médula y atrofia muscular. La atrofia muscular se debe a la denervación del músculo, a la pérdida del uso y podría ser consecuencia de un problema intrínseco de la miogénesis o por una alteración metabólica. Sin embargo, hay evidencias^{44,50} que sugieren que al menos en algunos casos la enfermedad podría iniciarse con un problema primario de la unión neuromuscular o en el propio músculo. Esta alteración en la miogénesis primaria tendría como consecuencia la atrofia muscular y afectación secundaria de la motoneurona⁴⁷.

Existe una nueva interpretación de la ELA que se basa en un enfoque de la enfermedad como periférica y metabólica^{47,50,52,53}. Algunos genes involucrados en la ELA familiar están implicados en el metabolismo celular⁵² y recientemente se ha relacionado con la regulación del metabolismo energético anaerobio muscular. Este hecho, apoya la implicación directa del músculo como tejido diana de la enfermedad reforzada por un estudio que afirma que los mioblastos procedentes de pacientes presentan una diferenciación a miotubos inadecuada²⁷.

Por otra parte, se ha visto que en algunos pacientes de ELA existe una alteración en la distribución de tipos de fibras en el músculo. Se da una mutación de fibras

glucolíticas de tipo IIa, fibras musculares de contracción rápida, metabolismo mayoritariamente glucolítico y resistentes a la fatiga, a fibras de tipo I, que son fibras musculares rojas, de contracción lenta, metabolismo oxidativo y gran resistencia a la fatiga. Cuando existe una alteración metabólica muscular, más concretamente una alteración en el metabolismo glucolítico, se produce una disminución en la síntesis de proteínas intrínsecas de la célula y se activa el metabolismo aeróbico como compensación que puede ser el responsable de ese cambio de fibra anaeróbica a aeróbica.

Además, el estado metabólico del músculo es primordial para el proceso de diferenciación muscular debido a la gran demanda de energía de este proceso. Más concretamente, en la glucólisis se liberan varios intermediarios necesarios para la biosíntesis de proteínas, coenzimas, ácido nucleicos... De hecho, uno de los factores más importantes para el proceso de diferenciación es la insulina⁴⁷.

Se ha descrito que los genes TDP43, FUS y SOD1 intervienen en la regulación del metabolismo energético^{51,52,53} y el silenciamiento de estos genes produce una disminución del metabolismo anaerobio^{46,48}.

En este trabajo se ha demostrado la implicación de estos genes en la regulación del proceso miogénico.

Los resultados indican que cuando estos genes se silencian se altera la miogénesis, lo que explicaría en parte la atrofia característica de esta patología. Lo que sugiere que en los casos de ELA derivados de mutaciones, en estos genes la miogénesis está comprometida aunque ello no significa que esto per se genere la degeneración de motoneurona.

Se ha podido ver que los genes TDP43, SOD y FUS regulan la expresión de las proteínas MyoD y Miogenina. Esta pérdida de expresión no está del todo claro si se debe a un proceso directo provocado por el silenciamiento génico de TDP43, SOD1 y FUS o si es secundario a la alteración del metabolismo muscular que se ha visto que generan estos silenciamientos.

Asimismo, los genes TDP43 y FUS tienen más repercusión en el silenciamiento en comparación con SOD1 que es menos agresiva (In press).

La desaparición de la expresión de MyoD aporta una naturaleza distinta a la célula, no propia del músculo, en la que es imprescindible su presencia. Asimismo, la

morfología que presentan los mioblastos silenciados nos recuerda en gran medida a fibroblastos, osteoclastos, condroblastos o células adipocíticas lo que nos sugiere que podría darse un paso retrógrado en el proceso de diferenciación muscular y reprogramarse las células hacia células menos diferenciadas.

En las líneas celulares TDP43 y FUS se observa como a partir de la confluencia 100% los mioblastos en vez de fusionarse y formar miotubos entran en apoptosis. Una de las razones de esta pérdida celular podría residir en el hecho de no poder seguir su proceso fisiológico de diferenciación muscular por la ausencia de sustancias tróficas que mantengan la viabilidad del mioblasto indiferenciado. Es decir, el propio proceso de diferenciación alterado genera la muerte de estas células. Sin embargo, en la línea celular SOD1 se observa la evolución de la miogénesis en el que las células diferencian a miotubo aunque su morfología no es convencional. Estas células forman una especie de sincitio. Como ocurre en las otras líneas celulares estudiadas, TDP43 y FUS, en ésta tampoco se expresa la MyoD. El aumento del estrés oxidativo generado por el propio silenciamiento de la superóxido dismutasa 1 en esta línea celular junto con el producido por el propio proceso miogénico, podrían estar detrás de la disfunción de la diferenciación celular en esta línea ShSOD1.

La ausencia de MyoD en las células hace que no expresen Miogenina, con lo que, no pueden seguir adelante en su proceso de formación de músculo pese a que estén en un medio que favorezca este proceso. La razón por la que esto ocurra es aún desconocida, aunque podría haber una alteración muy temprana en la miogénesis. Esto conduce a preguntarse si esta afectación podría ser aún más temprana y a afectar al proceso de diferenciación de células satélite a mioblastos, proceso regulado por proteínas más tempranas como la Pax 7⁴⁹.

Una de las características principales de la ELA es la atrofia muscular que padecen los pacientes. De los resultados de nuestro trabajo, se desprende que al menos una parte de la atrofia podría deberse a un fallo intrínseco primario del músculo derivado de la pérdida de la capacidad de diferenciación de los mioblastos. Añadiendo un factor primario a la atrofia muscular presente en la ELA. Es necesario profundizar en este campo por la relevancia de este nuevo enfoque de la patogenia de la ELA que

conduciría a clasificar a la la Esclerosis Lateral Amiotrófica además de como una enfermedad neurodegenerativa, como una miopatía, lo que abre nuevas perspectivas de comprensión de la enfermedad y de nuevos diseños terapéuticos.

BIBLIOGRAFIA

1. Kiernan MC, Vucic S, Cheah BC, Turner MR, Eisen A, Hardiman O, et al. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet*. 2011;377:942–55.
2. Logroscino G, Traynor BJ, Hardiman O, Chio' A, Couratier P, Mitchell JD, et al. Descriptive epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: New evidence and unsolved issues. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2008;79:6–11.
3. O'Toole O, Traynor BJ, Brennan P, Sheehan C, Frost E, Corr B, et al. Epidemiology and clinical features of amyotrophic lateral sclerosis in Ireland between 1995 and 2004. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2008;79:30–2.
4. Zarei S, Carr K, Reiley L, Diaz K, Guerra O, Altamirano PF, et al. A comprehensive review of amyotrophic lateral sclerosis. *Surg Neurol Int*. 2015 Nov 16;6:171.
5. Abhinav K, Stanton B, Johnston C, Hardstaff J, Orrell RW, Howard R, et al. Amyotrophic lateral sclerosis in South-East England: A population-based study. The South-East England register for amyotrophic lateral sclerosis (SEALS Registry) *Neuroepidemiology*. 2007;29:44–8.
6. Logroscino G, Traynor BJ, Hardiman O, Chiò A, Mitchell D, Swingler RJ, et al. Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Europe. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2010;81:385–90.
7. Matthew C Kiernan, Steve Vucic, Benjamin C Cheah, Martin R Turner, Andrew Eisen, Orla Hardiman, James R Burrell, Margaret C Zoing. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 2011; 377: 942–55.
8. Vázquez MC, Ketzoian C, Legnani C, Rega I, Sánchez N, Perna A, et al. Incidence and prevalence of amyotrophic lateral sclerosis in Uruguay: A population-based study. *Neuroepidemiology*. 2008;30:105–11.
9. Huisman MH, de Jong SW, van Doormaal PT, Weinreich SS, Schelhaas HJ, van der Kooij AJ, et al. Population based epidemiology of amyotrophic lateral

- sclerosis using capture-recapture methodology. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2011;82:1165–70.
10. Worms PM. The epidemiology of motor neuron diseases: A review of recent studies. *J Neurol Sci*. 2001;191:3–9.
 11. Ticozzi N, Vance C, Leclerc AL, Keagle P, Glass JD, McKenna-Yasek D, et al. Mutational analysis reveals the FUS homolog TAF15 as a candidate gene for familial amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2011;156B:285–90.
 12. Valdmanis PN, Rouleau GA. Genetics of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*. 2008;70:144–52.
 13. Rowland LP, Shneider NA. Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med*. 2001;344:1688–700.
 14. Zarranz JJ. *Neurología*. 5ªed. Elsevier SA; 2013.
 15. Motor Neuron Diseases Fact Sheet: National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS). November. 2010.
 16. Talbot K. Motor neurone disease. *Postgrad Med J*. 2002;78:513–9.
 17. Wijesekera LC, Leigh PN. Amyotrophic lateral sclerosis. *Orphanet J Rare Dis*. 2009;4:3.
 18. Goetz CG. Amyotrophic lateral sclerosis: Early contributions of Jean-Martin Charcot. *Muscle Nerve*. 2000;23:336–43.
 19. Dangoumau A, Verschueren A, Hammouche E, Papon MA, Blasco H, Cherpi-Antar C, et al. Novel SOD1 mutation p. V31A identified with a slowly progressive form of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging*. 2014;35:266.e1–4.
 20. Trias E, Ibarburu S, Barreto-Núñez R, Varela V, Moura IC, Dubreuil P, et al. Evidence for mast cells contributing to neuromuscular pathology in an inherited model of ALS. *JCI Insight*. 2017 Oct 19;2(20).
 21. AlSarraj S, King A, Cleveland M, Pradat PF, Corse A, Rothstein JD, et al. Mitochondrial abnormalities and low grade inflammation are present in the skeletal muscle of a minority of patients with amyotrophic lateral sclerosis; an observational myopathology study. *Acta Neuropathol Commun*. 2014;2:165.

22. EFNS Task Force on Diagnosis and Management of Amyotrophic Lateral Sclerosis. Andersen PM, Abrahams S, Borasio GD, de Carvalho M, Chio A, et al. EFNS guidelines on the clinical management of amyotrophic lateral sclerosis (MALS) – Revised report of an EFNS task force. *Eur J Neurol*. 2012;19:360–75.
23. Hardiman O, van den Berg LH, Kiernan MC. Clinical diagnosis and management of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurol*. 2011;7:639–49.
24. Brooks BR, Miller R, Swash M, Munsat TL. El Escorial revisited: Revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler*. 2000;1:293–9.
25. Bruce M. Carlson. *Embriología humana y biología del desarrollo*. 5° ed. Elsevier; 2014.
26. Sadler TW. *Langman, Embriología médica*. 12° ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2013.
27. Jensen L, Jørgensen LH, Bech RD, Frandsen U, Schrøder HD. Skeletal Muscle Remodelling as a Function of Disease Progression in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Biomed Res Int*. 2016;2016:5930621.
28. Park KH. Mechanisms of Muscle Denervation in Aging: Insights from a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Aging Dis*. 2015 Oct 1;6(5):380-9.
29. Manzano R, Toivonen JM, Oliván S, Calvo AC, Moreno-Igoa M, Muñoz MJ, et al. Altered expression of myogenic regulatory factors in the mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegener Dis*. 2011;8(5):386-96.
30. Hardiman O, Al-Chalabi A, Chio A, Corr EM, Logroscino G, Robberecht W, et al. Amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2017 Oct 20;3:17085.
31. Mathis S, Couratier P, Julian A, Corcia P, Le Masson G. Current view and perspectives in amyotrophic lateral sclerosis. *Neural Regen Res*. 2017 Feb;12(2):181-184.
32. Liu ZQ, Mahmood T, Yang PC. Western blot: technique, theory and trouble shooting. *N Am J Med Sci*. 2014 Mar;6(3):160.

33. Mahmood T, Yang PC. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci*. 2012 Sep;4(9):429-34.
34. Ling SC, Albuquerque CP, Han JS, Lagier-Tourenne C, Tokunaga S, Zhou H, et al. ALS-associated mutations in TDP-43 increase its stability and promote TDP-43 complexes with FUS/TLS. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jul 27;107(30):13318-23.
35. Schmid B, Hruscha A, Hogl S, Banzhaf-Strathmann J, Strecker K, van der Zee J, et al. Loss of ALS-associated TDP-43 in zebrafish causes muscle degeneration, vascular dysfunction, and reduced motor neuron axon outgrowth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Mar 26;110(13):4986-91 .
36. Yang C, Wang H, Qiao T, Yang B, Aliaga L, Qiu L, et al. Partial loss of TDP-43 function causes phenotypes of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Mar 25;111(12):E1121-9.
37. Igaz LM, Kwong LK, Lee EB, Chen-Plotkin A, Swanson E, Unger T, et al. Dysregulation of the ALS-associated gene TDP-43 leads to neuronal death and degeneration in mice. *J Clin Invest*. 2011 Feb;121(2):726-38.
38. Vanden Broeck L, Naval-Sánchez M, Adachi Y, Diaper D, Dourlen P, Chapuis J, et al. TDP-43 Loss-of-Function Causes Neuronal Loss Due to Defective Steroid Receptor-Mediated Gene Program Switching in *Drosophila*. *Cell Rep*. 2013 Jan 31;3(1):160-72.
39. Martin S, Al Khleifat A, Al-Chalabi A. What causes amyotrophic lateral sclerosis? *F1000Res*. 2017 Mar 28;6:371.
40. Brettschneider J, Del Tredici K, Toledo JB, Robinson JL, Irwin DJ, Grossman M, et al. Stages of pTDP-43 pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol*. 2013;74:20–38.
41. Logroscino G, Beghi E, Zoccolella S, Palagano R, Fraddosio A, Simone IL, et al. Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in southern Italy: a population based study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2005;76:1094–8.
42. Forbes RB, Colville S, Parratt J, Swingler RJ. The incidence of motor neuron disease in Scotland. *J Neurol*. 2007;254: 866–9.
43. Mitchell JD, Gattrell AC, Al-Hamad A, Davies RB, Batterby G. Geographical epidemiology of residence of patients with motor neuron disease in

- Lancashire and south Cumbria. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1999;65:842–7.
44. Hicks M, Pyle A. The path from Pluripotency to Skeletal Muscle: Development Myogenesis Guides the Way. *Cell Stem Cell*. 2015 Sep 3;17(3):255-7.
 45. Scaramozza A, Marchese V, Papa V, Salaroli R, Sorarù G, Angelini C et al. Skeletal muscle satellite cells in amyotrophic lateral sclerosis. *Ultrastruct Pathol*. 2014 Oct;38(5):295-302.
 46. Bradley LJ, Taanman JW, Kallis C, Orrell RW. Increased sensitivity of myoblasts to oxidative stress in amyotrophic lateral sclerosis peripheral tissues. *Exp Neurol*. 2009 Jul;218(1):92-7.
 47. Tixier V, Bataillé L, Etard C, Jagla T, Weger M, Daponte JP et al. Glycolysis supports embryonic muscle growth by promoting myoblast fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Nov 19;110(47):18982-7.
 48. Ohno Y, Oyama A, Kaneko H, Egawa T, Yokoyama S, Sugiura T et al. Lactate increases myotube diameter via activation of MEK/ERK pathway in C2C12 cells. *Acta Physiol (Oxf)*. 2018 Jan 27.
 49. Pradat PF, Barani A, Wanschitz J, Dubourg O, Lombès A, Bigot A et al. Abnormalities of satellite cells function in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler*. 2011 Jul;12(4):264-71.
 50. Loeffler JP, Picchiarelli G, Dupuis L, Gonzalez De Aguilar JL. The Role of Skeletal Muscle in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Brain Pathol*. 2016 Mar;26(2):227-36.
 51. Schmitt F, Hussain G, Dupuis L, Loeffler JP, Henriques. A plural role for lipids in motor neuron diseases: energy, signaling and structure. *Front Cell Neurosci*. 2014 Feb 20;8:25.
 52. Dupuis L, Pradat PF, Ludolph AC, Loeffler JP. Energy metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol* 2011; 10: 75–82.
 53. Dupuis L, Gonzalez de Aguilar JL, Echaniz-Laguna A, Eschbach J, Rene F, Oudart H et al. Muscle mitochondrial uncoupling dismantles neuromuscular junction and triggers distal degeneration of motor neurons. *PLoS One*. 2009;4(4):e5390.