

Trabajo Fin de Grado en Biotecnología

Estudio de la expresión génica de hSOD1 en animales
modelo SOD1G93A de distinta progresión de
Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA)

Study of hSOD1 gene expression in SOD1G93A model
animals of different progression of Amyotrophic
Lateral Sclerosis (ALS)



Autor/es

Gabriela Navarro Moreno

Director/es

Ana Cristina Calvo Royo

Laura Moreno Martínez

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



Universidad
Zaragoza

Facultad de Ciencias
2020-2021



Facultad de Ciencias
Universidad Zaragoza

ÍNDICE

Resumen	pág. 2
Español	pág. 2
Inglés	pág. 2
Introducción	pág. 3
Esclerosis Lateral Amiotrófica	pág. 3
<i>Definición</i>	pág. 3
<i>Etiología</i>	pág. 4
<i>Sintomatología</i>	pág. 4
<i>Diagnóstico</i>	pág. 5
<i>Tratamiento</i>	pág. 6
Modelos animales de la ELA	pág. 7
<i>Modelo de ratón SOD1G93A</i>	pág. 7
<i>Otros modelos animales de ELA</i>	pág. 8
Objetivos	pág. 10
Metodología	pág. 11
Genotipado del modelo animal SOD1G93A	pág. 11
<i>Extracción de DNA genómico</i>	pág. 11
<i>Genotipado de los animales mediante PCR</i>	pág. 11
<i>Electroforesis en gel de agarosa 3% en Tris-Borato-EDTA (TBE) 1x</i>	pág. 12
Extracción de DNA de muestras de cerebro	pág. 13
<i>Preparación de las muestras</i>	pág. 13
<i>Extracción de RNA</i>	pág. 13
<i>Extracción de DNA</i>	pág. 14
Análisis de la expresión génica de SOD1	pág. 14
Análisis estadístico	pág. 15
Resultados	pág. 17
Discusión	pág. 19
Conclusiones	pág. 22
Español	pág. 22
Inglés	pág. 22
Bibliografía	pág. 23
Anexos	pág. 25
Anexo 1. Soluciones empleadas	pág. 25
Anexo 2. Secuencia de los primers utilizados en las PCR	pág. 25
Anexo 3. Características de los individuos de los grupos control y de tratamiento	pág. 26

RESUMEN

ESPAÑOL

La esclerosis lateral amiotrófica o ELA es una enfermedad neurodegenerativa que afecta a las neuronas motores superiores del cerebro y a las neuronas motoras inferiores del tronco encefálico y de la médula espinal, produciendo un deterioro progresivo que termina en una parálisis mortal. Se distinguen dos clases de ELA: la primera de ellas es la ELA familiar, que afecta al 5-10% de los pacientes y está producida por una alteración genética heredable; la segunda es la ELA esporádica, cuyas causas genéticas se desconocen y afecta entorno al 90-95% de los pacientes de ELA. La alteración de la enzima SOD1 se ha observado en el 12-20% de los pacientes de ELA familiar y en el 1% de los pacientes de ELA esporádica. La enzima superóxido dismutasa Cu-Zn o SOD1 es una enzima citosólica que es capaz de eliminar los radicales superóxido que se forman en el interior celular. La complejidad de la enfermedad dificulta el encontrar modelos animales adecuados y también el trasladar los resultados obtenidos a la clínica. En este proyecto se ha trabajado con el modelo de ratón SOD1G93A, que permite caracterizar las etapas de progresión de la enfermedad y desarrollar nuevas terapias. Es un modelo especialmente útil en el estudio de las formas más agresivas de la enfermedad. Sin embargo, se ha observado que en ocasiones puede producirse la pérdida de copias del transgén, lo que altera el fenotipo que presentan los ratones. En este trabajo se determina el número de copias de los ratones utilizados para comprobar si se mantiene constante entre los individuos sometidos a un tratamiento antioxidante y los individuos control, y se analiza si el número de copias se encuentra relacionado con la longevidad de los animales independientemente del tratamiento recibido.

INGLÉS

Amyotrophic lateral sclerosis or ALS is a neurodegenerative disease that affects the upper motor neurons of the brain and the lower motor neurons of the brainstem and spinal cord, producing a progressive deterioration that ends in fatal paralysis. There are two classes of ALS: the first is familial ALS, which affects 5-10% of patients and is caused by an inheritable genetic alteration; the second is sporadic ALS, whose genetic causes are unknown and affects around 90-95% of ALS patients. Alteration of the SOD1 enzyme has been observed in 12-20% of familial ALS patients and in 1% of sporadic ALS patients. The enzyme Cu-Zn superoxide dismutase or SOD1 is a cytosolic enzyme that is capable of eliminating superoxide radicals that form inside the cell. The complexity of the disease makes it difficult to find suitable animal models and also to transfer the results obtained to the clinic. This project has worked with the SOD1G93A mouse model, which allows characterizing the stages of disease progression and developing new therapies. It is an especially useful model in the study of the most aggressive forms of the disease. However, it has been observed that on occasions the loss of copies of the transgene can occur, which alters the phenotype that the mice present. In this work, the number of copies of the mice used is determined to check if it remains constant between the individuals subjected to an antioxidant treatment and the control individuals, and it is analyzed if the number of copies is related to the longevity of the animals independently of the treatment received.

INTRODUCCIÓN

ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA (ELA)

Definición

La esclerosis lateral amiotrófica o ELA es una enfermedad neurodegenerativa que afecta a las neuronas motoras superiores del cerebro y a las neuronas motoras inferiores del tronco encefálico y de la médula espinal. Se produce un deterioro progresivo que deriva en una parálisis mortal. Se clasifica en dos tipos: familiar y esporádica. La ELA familiar está producida por una alteración genética heredable, y supone en torno al 5-10% de los enfermos de ELA. Esta forma de la enfermedad se manifiesta al final de la adolescencia o al inicio de la edad adulta. En el caso de la ELA esporádica se desconocen las causas genéticas que dan lugar a la patología, aunque se ha planteado que pueda deberse a anomalías del sistema inmunológico, disfunción mitocondrial, exposición tóxica o toxicidad por glutamato, entre otras opciones. La edad de inicio de la ELA esporádica es variable dentro del rango entre los 40 y 70 años, y afecta al 90-95% restante de los enfermos de ELA. (1-3)

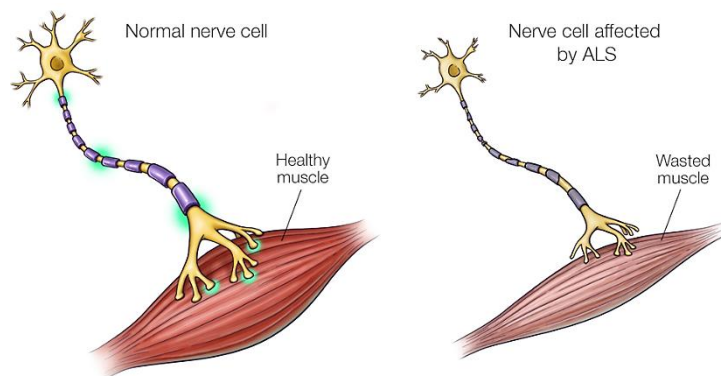


Figura 1. Comparativa de una motoneurona normal y una motoneurona de un paciente de ELA.(4)

Pese a que el pronóstico de supervivencia es de tan solo de 2 a 5 años, el 20% de los pacientes vive 5 años, el 10% durante 10 años y el 5% llega a vivir 20 años o incluso más. La supervivencia puede variar según el tipo de ELA. Los pacientes de ELA con una edad temprana de inicio de la enfermedad, o con una forma de inicio en las extremidades inferiores y un menor tiempo de diagnóstico suelen asociarse con una supervivencia más prolongada. Por el contrario, los enfermos con una edad más avanzada al inicio de los síntomas, una forma de inicio bulbar y una disfunción temprana de los músculos respiratorios se asocian con una menor supervivencia.(1,2)

La ELA se produce mayoritariamente en hombres, siendo la proporción aproximada entre hombres y mujeres de 3:1. En España se diagnostican cerca de 900 nuevos casos de ELA al año, siendo el número total de casos en 2020 de alrededor de 4000 enfermos. Su incidencia es de 1 caso por cada 50.000 habitantes y posee una prevalencia de 1/10.000.(2,5)

Etiología

En la ELA esporádica todavía se desconocen sus causas, aunque se han observado inclusiones citoplasmáticas ubiquitinadas en la médula espinal. La ubiquitinación suele asociarse a vías de degradación de proteínas anormales o que muestran un mal funcionamiento. En la ELA estas inclusiones no se eliminan adecuadamente y se van acumulando a medida que avanza la enfermedad, lo que altera la homeostasis celular y deriva en el deterioro y pérdida funcional de las células afectadas. Además, existen muchas variantes de ELA y se ha observado que hay ciertos agregados que se encuentran únicamente en determinados subtipos de ELA.(1,3)

En la ELA familiar, entre las causas genéticas destacan las expansiones de repeticiones en el marco de lectura abierto del gen 72 del cromosoma 9 (C9orf72), siendo la más común la repetición del hexanucleótido G4C2. Estas alteraciones se observan en el 40% de los pacientes de ELA familiar, y en cerca del 10% de pacientes sin antecedentes familiares de la enfermedad. Además, se han estudiado mutaciones en los genes que codifican la proteína de unión al DNA de respuesta transactiva 43 (TDP-43), la superóxido dismutasa 1 cobre-zinc (SOD1) y la proteína de fusión en el sarcoma (FUS), y se han relacionado con más del 50% de los casos de ELA familiar.(2,3)

En este trabajo nos interesa destacar especialmente el papel de la enzima superóxido dismutasa 1 cobre-zinc. La SOD1 es una enzima citosólica con la capacidad de eliminar radicales superóxido que se forman habitualmente en el interior celular, pero pueden ser tóxicos para los sistemas biológicos. La alteración de esta enzima se ha observado en el 1% de la ELA esporádica y en el 12-20% de la ELA familiar. Inicialmente se había planteado que la pérdida de función de SOD1 producía la enfermedad, pero esas mutaciones no producían una pérdida significativa de neuronas, sino que es la ganancia de función de las mutaciones de la SOD1 lo que producía la enfermedad. Hasta el año 2020 se han descrito 187 variantes de SOD1 en pacientes con ELA, siendo éste un campo en continua expansión debido fundamentalmente al descubrimiento de nuevas causas genéticas a través del proyecto Mine, en el que se sigue secuenciando el genoma de todos los pacientes de ELA a nivel mundial.(1,3,6,7)

Los factores genéticos no son los únicos que afectan al desarrollo de la ELA, sino que esta también se ve influenciada por factores ambientales. La identificación de los factores de riesgo ambientales no ha sido sencilla, principalmente porque la exposición a ellos puede cambiar con el tiempo o puede no registrarse adecuadamente. Algunos de los factores que se han determinado hasta el momento son: fumar, la actividad física intensa, exposición a metales pesados, productos químicos agrícolas y la βN-metilamino-L-alanina entre otros.(2)

Sintomatología

La sintomatología de la ELA se caracteriza por la palidez del tracto corticoespinal a causa de la pérdida de neuronas motoras, el depósito de agregados proteicos patológicos y la presencia de inclusiones positivas de ubiquitina dentro de las neuronas motoras supervivientes. Por un lado, la alteración de las neuronas motoras superiores da lugar a reflejos enérgicos y una coordinación más lenta de las extremidades con espasticidad y rigidez de los músculos. Por otro lado, el fallo

de las neuronas motoras inferiores inicialmente produce fasciculaciones o contracciones musculares espontáneas, y más adelante deriva en una atrofia progresiva debida a la pérdida de las sinapsis musculares. Los síntomas que afectan a las extremidades dificultan tareas sencillas como sostener una taza, abrocharse una camisa o caminar de forma normal. Además, un tercio de los enfermos experimentan enfermedad bulbar, que entre otros síntomas dificulta el habla, el masticar o tragar, produce debilidad facial y atrofia de la lengua.(1,2)

Otros síntomas que presentan las personas afectadas por la ELA son la fatiga, el dolor no neuropático asociado a problemas secundarios en la espalda y las articulaciones, depresión, ansiedad y debilidad respiratoria que finalmente deriva en fallo respiratorio (principal causa de muerte en esta enfermedad). Por lo general, los pacientes conservan las funciones mentales superiores, lo que les permite razonar, resolver problemas, comprender y recordar. Los pacientes no suelen progresar de manera lineal, sino que pueden pasar temporadas de semanas o meses en las que no se produce casi ninguna pérdida de función y luego volver a empeorar. Estas mejoras o “paradas” de la enfermedad suelen ser fugaces, siendo menos del 1% de los afectados capaces de mantener una mejoría durante 12 meses. (1,2)

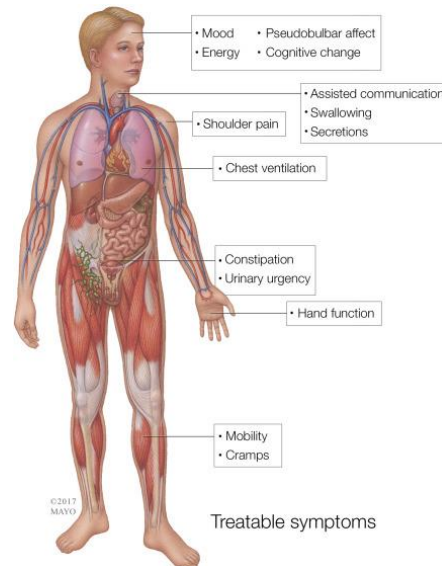


Figura 2. Ilustración de algunos de los síntomas asociados a la ELA. (2)

Diagnóstico

En la actualidad se intenta conseguir un diagnóstico más temprano para poder tratar a los pacientes lo antes posible. Sin embargo, se estima que desde el inicio de los síntomas hasta el diagnóstico de la enfermedad pueden transcurrir entre 9 y 12 meses. La causa de este retraso en el diagnóstico se debe fundamentalmente a la dificultad de detectar la enfermedad dado que no tiene un origen común conocido en todos los casos de ELA y, además, esta enfermedad presenta una sintomatología y una clínica común a otras patologías neurodegenerativas o de motoneurona, lo que dificulta todavía más su diagnóstico temprano. Por este motivo, cuando se consigue diagnosticar a los pacientes de ELA, normalmente presentan entre un 50-70% de las neuronas motoras no funcionales, por lo que la enfermedad se encuentra bastante avanzada. (1,2)

A nivel clínico, primero suele realizarse un diagnóstico diferencial para excluir otras afecciones. Posteriormente se lleva a cabo un examen clínico y evaluaciones electrofisiológicas, como la electromiografía y estudios de conducción nerviosa. También se realizan estudios de neuroimagen y serología, y en pocas ocasiones se utilizan biopsias nerviosas y musculares o análisis del líquido cefalorraquídeo para descartar otras enfermedades. Si el paciente tiene antecedentes familiares de ELA se recomienda realizar pruebas genéticas. Gracias a los estudios realizados en los últimos años se han descubierto biomarcadores y genes asociados a la enfermedad, lo que facilita el desarrollo de futuros métodos de diagnóstico más específicos,

aunque todavía no se han descubierto biomarcadores que sean comunes a todas las formas de la enfermedad. Por esta razón, la electromiografía es la prueba diagnóstica más precisa en esta enfermedad. (1,2)

La dificultad en el diagnóstico de la ELA ha dado lugar a establecer unos criterios internacionales, conocidos como criterios del El Escorial revisados, y también conocidos como criterios Awaji-Shima (J. Costa *et al.* 2012) (8). En función de estos criterios, la ELA puede clasificarse en cuatro categorías:

- ELA clínicamente definida: debe haber evidencias de afectación de neuronas motoras inferiores (LMN) y signos de, o bien de afectación de neuronas motoras superiores (UMN) en tres regiones espinales, o bien afectación de UMN en la región lumbar y al menos dos regiones espinales.
- ELA clínicamente probable: hay evidencias de afectación de UMN y LMN en al menos dos regiones, con deterioro a nivel de motoneurona superior que puede propagarse hacia la motoneurona inferior.
- ELA probable con apoyo laboratorial: dentro de esta categoría se encuentran los casos en los que se observan signos clínicos de disfunción de UMN y LMN en una única región, pero también se observan signos electrofisiológicos de pérdida de LMN en al menos dos regiones.
- ELA clínicamente posible: debe haber evidencias de disfunción de LMN y UMN en una sola región. También incluye cuando se observan signos de disfunción de UMN en al menos dos regiones o hay signos de disfunción de LMN frente a los de UMN. También puede propagarse el deterioro desde las motoneuronas superiores a las motoneuronas inferiores.

Hay que destacar que cuando se habla de evidencias se hace referencia a evidencias clínicas o electrofisiológicas.(8)

Tratamiento

La ELA es una enfermedad que no tiene cura puesto que se desconoce su origen etiopatogénico (1,2). Hasta la fecha, se han aprobado dos medicamentos por la FDA, aunque están principalmente dirigidos a paliar los síntomas. El Riluzol fue el primer medicamento aprobado por la FDA en 1995. Se trata de un inhibidor de la liberación de glutamato y en ensayos clínicos se observó un beneficio de supervivencia de casi 3 meses, aunque su potencia es limitada. Más recientemente, en 2017, la FDA aprobó el medicamento Edaravone, un eliminador de radicales libres que se administra de forma intravenosa, aunque se está intentando administrar de forma oral. (2)

Dada la potencia limitada de estos fármacos, la principal estrategia es un enfoque interdisciplinario para tratar los síntomas y necesidades de los pacientes. Se realizan evaluaciones cognitivas y conductuales para observar cómo afecta al curso de la enfermedad. La fisioterapia y la terapia ocupacional permiten proporcionar un rango de movimiento y ejercicios para disminuir el dolor. La espasticidad de las extremidades es un síntoma de la

neurona motora superior que puede producir dolor y limita la funcionalidad, pero puede ser más útil que la flacidez de cara a realizar ciertas acciones que faciliten la movilidad o el traslado de los pacientes. Conforme se agrava la enfermedad, la ventilación asistida puede tanto prolongar como mejorar la calidad de vida del paciente. El 25-50% de los pacientes de ELA desarrollan una condición neurológica conocida como afectación pseudobulbar o trastorno de expresión emocional inapropiada. Esta condición se caracteriza por la tendencia a reír o llorar de forma incontrolada. Puede llegar a controlarse con medicamentos en combinaciones de dextrometorfano y quinidina.(2)

Actualmente se están desarrollando estrategias y estudios para futuros tratamientos más eficaces para la ELA. La terapia con células madre va dirigida a proteger a las neuronas motoras supervivientes mediante efectos paracrinos (2). Más recientemente ha cobrado fuerza el enfoque de los oligonucleótidos antisentido y se ha planteado el complementar este método con terapia génica mediante el uso de vectores virales que administren RNA de interferencia que impidan la expresión de determinadas mutaciones genéticas que actúan con ganancia de función (2,3). Por último, se ha desarrollado un fármaco inhibidor de la tirosina quinasa, conocido como Masitinib, que actualmente se encuentra en ensayos clínicos de fase III en combinación con el Riluzol (2).

MODELOS ANIMALES DE LA ELA

Modelo de ratón SOD1G93A

Anteriormente hemos comentado que, dentro de la ELA, el 10% de los casos se corresponden a ELA familiar, dentro de los cuales cerca de un 20% tiene mutaciones de la SOD1. Esto impulsó al grupo de Gurney y colaboradores a desarrollar el modelo animal de ratón SOD1G93A. Los ratones SOD1G93A se obtuvieron inyectando el transgén con la mutación G93A en embriones fertilizados de ratones híbridos C57BL6/SJL F1 (7). De esta forma, los ratones poseen su propia SOD1 wildtype y también sobreexpresan la SOD1 humana mutada. Los ratones se cruzaron posteriormente con ratones C57BL6. Estos ratones fueron producidos por DNX (Princeton, New Jersey) a través de la Instalación Nacional de Desarrollo Transgénico. El grupo de Gurney observó que los ratones que expresaban mayores cantidades de SOD1 mutante en el cerebro desarrollaban un síndrome compatible con la enfermedad de la motoneurona. En torno a los 3-4 meses de edad, los ratones empezaron a mostrar una cierta debilidad en las patas traseras, su pelaje adquiría una apariencia tosca y mostraban una mayor delgadez en sus flancos. Más adelante sufrían la parálisis de una o más de sus extremidades, y a los 5 meses de edad fueron sacrificados ya que no eran capaces de buscar comida o agua.(7,9)

En estudios posteriores se analizó en más profundidad este modelo animal. Se observó que la ELA familiar era causada por mutaciones de ganancia de función de SOD1 y no por alteraciones de pérdida de función, ya que en experimentos con ratones knock-out de SOD1 no se producía la enfermedad. Se demostró que el progreso de la enfermedad varía sistemáticamente con la expresión de la proteína. En ratones SOD1G93A con una alta expresión se observaba una patología principalmente vacuolar diferente a la observada en la médula espinal en ELA. Esta enfermedad provoca una fragmentación del aparato de Golgi similar a la observada en la ELA.

Estos ratones también presentan gliosis, ubiquitinación citoplasmática, fosforilación somática de neurofilamentos, esferoides ocasionales, procesos inflamatorios a nivel axonales e inclusión por cuerpos de Lewy. Conforme se produce la pérdida de las neuronas motoras se va desarrollando un proceso de denervación muscular, así como una disminución de los potenciales compuestos de acción de los músculos, una reinervación axonal compensatoria, una disminución de las unidades motoras y un aumento de las fibrilaciones a nivel muscular. También se produce la pérdida de neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo de manera similar a la ELA. Se piensa que este fenómeno puede ser debido a la sensibilidad de estas neuronas al daño oxidativo. Por otro lado, los ratones SOD1G93A de baja copia se caracterizan por un progreso más lento de la enfermedad y una mayor supervivencia que los que sobreexpresan un número elevado de copias de la SOD1. En los ratones de baja copia la patología en la médula espinal es más similar a la ELA con ausencia de cambios vacuolares. Por otro lado, siguen mostrando pérdida de neuronas motoras, alteraciones de tipo inflamatoria a nivel axonal, gliosis reactiva e inclusiones ubiquitinadas de cuerpos de Lewy. Dado que la mayoría de los casos de ELA en pacientes suele tener una progresión rápida y severa, se suele escoger el modelo animal de alta copia para poder trasladar los resultados a pacientes. (7,9–11)

Tanto en el modelo de baja como en el de alta copia, el número de copias transgénicas de la SOD1 que presente el ratón va a determinar la cantidad de proteína mutante que se expresa, y a su vez la aparición de la enfermedad y la supervivencia del ratón. La reducción del número de copias da lugar a una aparición de la enfermedad más retrasada y un aumento de la supervivencia de los ratones. La pérdida de copias del gen mutante puede producirse por eventos de recombinación. En un estudio publicado en 2004 por Guillermo M. Alexander y colaboradores mostraban que, durante 4 años, el 3,6% de los ratones transgénicos machos utilizados como reproductores tuvieron descendencia con un número reducido de copias. Más adelante, otro estudio (Alexandre Henriques *et al.* 2010)(11) obtuvo resultados similares y se llegó a la conclusión de que un menor número de copias transgénicas provocaba un retraso en el inicio de la enfermedad y una mayor supervivencia.(9–11)

Se ha determinado que en el modelo de ratón SOD1G93A el fenotipo clínico se mantiene estable siempre que el número de copias del transgén sea constante. Por lo tanto, dado que se pueden producir pérdidas de copias incluso tras un largo tiempo de reproducción, es importante realizar un control del número de copias en todos los animales de este modelo que se utilicen para reproducción y/o experimentos.(9–11)

Otros modelos animales de ELA

Además del modelo de ratón SOD1G93A existen otros modelos animales para estudiar la ELA. A la hora de elegir un modelo u otro es interesante que sea un modelo que replique la enfermedad en pacientes y que el mecanismo que induce el fenotipo de la enfermedad refleje lo que causa en la enfermedad en pacientes. No existe un modelo perfecto, todos ellos muestran características patológicas similares a la ELA y también otras diferentes (10,12). A continuación, se describen algunos de los modelos animales para la ELA:

- Modelo de ratón FVB-C9orf72 BAC
Es un modelo de ratón que desarrolla características parecidas a la ELA como parálisis, deterioro de la integridad de la unión neuromuscular, pérdida de neuronas motoras, acumulación nuclear de RNA con una estructura secundaria alterada (resulta tóxico para las células), agregación citoplasmática de TDP-43, agregación de proteína DPR (proteína de repetición de dipéptido) y reducción de la supervivencia. El principal inconveniente que presenta este modelo es que tiene una penetrancia incompleta. En el caso de las hembras completamente penetrantes la enfermedad se desarrolla y finaliza con una muerte a los 6 meses de edad. Sin embargo, en los machos completamente penetrantes no se observa este fenotipo.(12)
- Modelo de pez cebra knockdown C9orf72
Este modelo es uno de los pocos que respalda la hipótesis de la patogénesis por pérdida de función. También se han desarrollado otros modelos de pez cebra C9orf72 correspondientes a una ganancia de función tóxica. Este modelo resulta interesante ya que en tejidos post-mortem de pacientes se han observado niveles reducidos de transcripción de *C9orf72*. (12)
- Modelo de pez cebra G93R-mSOD1
En este modelo se produce una degeneración motora progresiva en la edad adulta, e imita muchos aspectos que da la enfermedad en pacientes. Sin embargo, no se han encontrado evidencias de denervación muscular.(12)
- Modelo de ratón TDP43-Q331K
En este modelo se produce una ligera sobreexpresión de TDP-43 mutante humano. Se encuentra bajo el control del promotor de la proteína priónica y presenta características similares a la ELA, tales como una reducción del número de uniones neuromusculares, disfunción motora progresiva, degeneración de las neuronas motoras a los 10 meses de edad y atrofia muscular. Posee la desventaja de que el fenotipo motor se encuentra restringido a las neuronas motoras inferiores, la degeneración progresiva a los 20 meses se detiene y los resultados parecidos a los de la ELA no son letales en estos ratones. Además, no se han encontrado evidencias de agregación citosólica de TDP-43 o exportación nuclear. (12)
- Modelo de pez cebra TDP43-A315T
Este modelo está basado en la introducción de mRNA de TDP-43 mutante humano. Se observan defectos en la función motora, en la ramificación de los axones motores, y no hay evidencias de agregación de TDP-43 en el citoplasma. Cuando se introduce mRNA de TDP-43 wildtype se han observado defectos motores leves.(12)

OBJETIVOS

El objetivo principal de este TFG se basa en cuantificar la expresión génica de hSOD1 en el modelo animal SOD1G93A con el fin de valorar si el fenotipo de los ratones se mantiene estable. Para alcanzar este objetivo, se plantean los siguientes objetivos secundarios:

- Determinar y cuantificar en cerebro mediante PCR cuantitativa si el número de copias de la SOD1 mutante que expresa el modelo animal se mantiene constante en animales transgénicos SOD1G93A frente a otro grupo de animales transgénicos que ha sido sometido a un tratamiento antioxidante.
- Analizar, en caso de que no se encuentren diferencias en el número de copias de la SOD1, si la expresión de SOD1 se correlaciona con la longevidad de los ratones, independientemente del tratamiento recibido.

METODOLOGÍA

GENOTIPADO DEL MODELO ANIMAL SOD1G93A

Extracción de DNA genómico

En primer lugar, se debe extraer el DNA genómico de los ratones SOD1G93A para poder realizar una PCR que nos permita identificar la presencia del gen SOD1 mutado en estos animales.

Partimos de las muestras de falanges de ratones guardadas en tubos eppendorf. El primer paso consiste en añadir a la muestra 300 µl de NaOH 50 mM (Anexo 1). El NaOH desestabiliza la membrana celular, facilitando la degradación del tejido y la liberación del DNA al medio. A continuación, se colocan las muestras en un termobloque a 98°C y 400 rpm durante 1 hora o hasta que el tejido se lise por completo. A continuación, se debe neutralizar la acción del NaOH con 30 µl de Tris 1M a pH 8 (Anexo 1) para proteger el DNA de cambios en el pH que podrían desestabilizarlo. Tras añadir la solución de Tris se agitan las muestras brevemente en el vórtex y se centrifugan a 14000 rpm durante 6 minutos. Por último, se transfiere el sobrenadante de cada muestra a un nuevo tubo y se guarda a -20°C para su posterior uso.

Genotipado de los animales mediante PCR

La PCR o reacción en cadena de la polimerasa es una técnica desarrollada en 1983 por Kary Mullis (Mullis, K, 1990), que permite la amplificación de una región específica de DNA (13). De esta forma se puede amplificar una gran cantidad de la secuencia deseada, aunque en la muestra original se encuentre de forma escasa o en una concentración reducida. Esta técnica necesita los siguientes componentes: un buffer para ajustar el pH y la fuerza iónica del medio, Taq polimerasa (DNA polimerasa), cloruro de magnesio, los cebadores o primers complementarios a cada una de las hebras de la región que queremos amplificar y el DNA molde.

En este caso se preparó un mix con dichos componentes en las cantidades que se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Componentes del mix de PCR. OIMR42 y OIMR43 corresponden a los primers del gen IL-2 utilizado como control, mientras que OIMR113 y OIMR114 son los primers para el gen hSOD1. Su secuencia puede consultarse en el Anexo 2.

Componentes	Cantidad (µl)
H ₂ O	12 µl
dNTPS 1.25 mM	3,2 µl
Buffer 10x	2 µl
MgCl ₂ 100 mM	0,4 µl
OIMR42 20 µM	0,4 µl
OIMR43 20 µM	0,4 µl
OIMR113 20 µM	0,2 µl
OIMR114 20 µM	0,2 µl
Taq polimerasa	0,2 µl
DNA	1 µl
Volumen final	20 µl

Se utilizan dos parejas de primers o cebadores: por un lado, un par de primers para la amplificación de la secuencia hSOD1 mutada, que nos permitirá identificar a los animales enfermos. Por otro lado, el segundo par de primers para la detección del gen de la interleucina 2 (IL-2), que se utiliza como control. De esta forma, cuando se visualicen las muestras en un gel de agarosa tras la PCR se observarán dos bandas en los individuos que posean la mutación en hSOD1 (una banda por la presencia del gen hSOD1 mutado y otra por el gen IL-2), mientras que en los individuos sanos solo se observará una única banda correspondiente a IL-2. Es importante asegurarse de que ambos primers tengan temperaturas de fusión similares para que se produzca una correcta amplificación, y que los fragmentos que se amplifiquen sean de tamaños diferentes para una mejor diferenciación en el gel de electroforesis.

Además de preparar el mix con cada una de las muestras también debe prepararse un control negativo (sin hSOD1), un control positivo (con hSOD1) y un blanco (no se añade DNA) para asegurar que no se comete ningún error y la amplificación se produce correctamente.

Una vez se han añadido todos los componentes se agitan las muestras con el vórtex y se centrifuga a 16000 rpm. A continuación, se introducen en el termociclador para su amplificación. El termociclador sigue el siguiente programa: Primero aumenta la temperatura hasta 95°C durante tres minutos, siendo entonces cuando se inicia el primer ciclo. Se mantiene la temperatura de 95°C treinta segundos y luego baja a 60°C, temperatura a la que permanece otros treinta segundos. Después, se alcanzan los 72°C durante treinta segundos, terminando el primer ciclo. Tras una serie de ciclos, para finalizar el programa, se baja la temperatura a 4°C.

Se realiza un total de 30 ciclos y se van amplificando las secuencias de DNA, multiplicándose por 2ⁿ en cada ciclo, pero a partir del ciclo 30 deja de aumentar el producto de amplificación.

Electroforesis en gel de agarosa 3% en Tris-Borato-EDTA (TBE) 1x

Con el objetivo de visualizar las regiones amplificadas con la PCR se realiza una electroforesis. Previamente a llevarla a cabo es necesario preparar un gel de agarosa al 3% en TBE 1x en el que se cargarán las muestras tras la PCR. El tampón TBE está compuesto por Tris, borato y EDTA. El Tris y el borato poseen una función tamponante para mantener el pH deseado, mientras que el EDTA actúa como quelante de cationes divalente, siendo especialmente relevante al quelar Mg²⁺, evitando la degradación de los ácidos nucleicos por posibles nucleasas que requieren el Mg²⁺ como cofactor. Al gel de agarosa se le añade un colorante fluorescente de ácidos nucleicos (GelGreen) que permitirá visualizar las bandas obtenidas tras la electroforesis, con ayuda de un transiluminador.

Se añaden 10 µl de tampón de carga a las muestras amplificadas por PCR, incluyendo el control positivo, el control negativo y el blanco. Luego se homogeneiza y se carga un volumen de 10 µl en cada pocillo del gel de agarosa. Una vez se han cargado todas las muestras se realiza la electroforesis a 60-70 A durante 30 minutos. Pasado ese tiempo se comprueba la separación de las bandas y se observa el gel con ayuda de un transiluminador.

EXTRACCIÓN DE DNA DE MUESTRAS DE CEREBRO

Preparación de las muestras

Partimos de muestras de cerebro de los ratones SOD1-G93A genotipados anteriormente. Para llevar a cabo el protocolo de extracción de DNA partimos de una cantidad inicial de 100 mg de cada una de las muestras. Con este objetivo, se pesa cada cerebro completo y se coloca sobre una placa de Petri refrigerada para evitar la total descongelación del tejido mientras se manipula. Con ayuda de pinzas y un bisturí se cortan trozos de cerebro hasta conseguir la cantidad de 100 mg. Una vez pesados los 100 mg de cerebro, se guarda cada muestra en un eppendorf marcado y se almacenan a -80°C .

Extracción de RNA

Durante este procedimiento se mantienen las muestras en hielo cuando no se estén manipulando, ya que con RNA se recomienda trabajar a 4°C . El primer paso es pulverizar el tejido utilizando TissueLyser, lo que permite lisar una gran variedad de tejidos sin dañar las proteínas, el DNA o el RNA en el proceso.

Se parte de los 100 mg de tejido situados en los tubos y se añade una pequeña bola de acero inoxidable. A continuación, se añade 1 ml de QIAzol Lysis Reagent por cada 100 mg de muestra. Mientras se trabaja con QIAzol es importante hacerlo en una campana de flujo laminar. Tras añadir el reactivo se colocan las muestras en el TissueLyser a 50 Hz durante 5 minutos. Pasado ese tiempo se centrifugan las muestras durante 1 minuto a 12000 g y 4°C . Luego se transfiere el sobrenadante a un nuevo tubo y se deja incubar las muestras a temperatura ambiente durante 5 minutos. Este paso favorece la disociación de los complejos nucleoproteicos. Posteriormente se añaden 0,2 ml de cloroformo, se agita manualmente durante 15 segundos y se deja a temperatura ambiente 2-3 minutos. Después, se centrifugan los tubos a 12000 g y 4°C durante 15 minutos. El cloroformo es un compuesto orgánico que permite separar en fases las muestras. Tras la centrifugación en cada tubo se observan tres fases (Figura 3):

- Zona superior: fase acuosa transparente en la que se encuentra el RNA.
- Interfase: posee un aspecto blanquecino.
- Zona inferior: fase orgánica de color rosado en la que se sitúa el DNA.

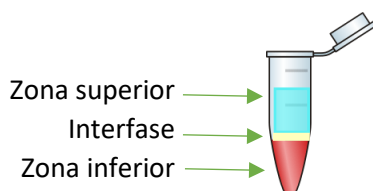


Figura 3. Representación gráfica de la separación de fases.

Se transfiere la fase acuosa a un tubo nuevo y se añaden 0,5 ml de isopropanol que ayudará a precipitar el RNA. Seguidamente se mezcla con vórtex y se deja a temperatura ambiente 10 minutos. Los tubos con la fase orgánica y la interfase se guardan a 4°C para la posterior extracción de DNA. Pasado ese tiempo se centrifugan los tubos 10 minutos a 12000 g y 4°C . Tras sacar los tubos de la centrífuga se descarta el sobrenadante y se añade 1 ml de etanol 75% (el

etanol limpia el pellet de RNA). A continuación, se centrifugan los tubos a 7500 g y 4°C durante 5 minutos. El siguiente paso es retirar el sobrenadante por completo y dejar secar al aire los pellets de RNA durante 15-30 minutos. Una vez se han secado correctamente se redisuelve el pellet en 50 µl de agua libre de RNAsas. Finalmente, se mide la cantidad y calidad de RNA de las muestras con Nanodrop.

Extracción de DNA

La extracción de DNA se inicia a partir de los tubos con la fase orgánica y la interfase. El primer paso es retirar cualquier resto de fase acuosa que quede en los tubos. Después, se añaden 0,3 ml de etanol 100% y se mezcla por inversión. Tras incubar las muestras a temperatura ambiente 2-3 minutos se centrifugan a 3000 g y 4°C durante 5 minutos para sedimentar el DNA. Luego se retira el sobrenadante y se añade 1 ml de la solución de citrato de sodio 0,1M en 10% de etanol. Se dejan incubar las muestras a temperatura ambiente durante 30 minutos, mezclando por inversión cada 5 minutos. Pasado ese tiempo se centrifuga 5 minutos a 3000 g y 4°C. Una vez se sacan los tubos de la centrifuga se retira el sobrenadante y se añade 1 ml de la solución de citrato de sodio 0,1M. Durante los siguientes 30 minutos se dejan las muestras a temperatura ambiente, mezclando por inversión cada 5 minutos.

A continuación, se retira el sobrenadante, se añaden 1,9 ml de etanol 75% y se deja incubar a temperatura ambiente, mezclando por inversión cada 5 minutos durante un total de 20 minutos. El etanol lava el pellet de DNA y elimina el color rosado. El siguiente paso es centrifugar los tubos a 3000 g y 4°C durante 5 minutos, después de los cuales se retira el sobrenadante y se deja secar al aire durante 15 minutos. Una vez se obtiene el pellet de DNA seco, se resuspende en 300 µl de NaOH 8 mM. Inicialmente se redisolvió el pellet en un volumen de 600 µl (muestras 4315 y 4171), pero se redujo a 300 µl para obtener una concentración más idónea. Se utiliza una base débil como NaOH ya que el DNA no se resuspende correctamente en agua o tampones Tris.

Seguidamente se centrifugan las muestras a 14000 g y temperatura ambiente para retirar el material insoluble. Después de la centrifugación se transfiere el sobrenadante a un nuevo tubo y se añaden 30 µl de HEPES 0,1 M y 2,8 µl de EDTA 100 mM para ajustar el pH. En el caso de haber añadido previamente 600 µl de NaOH 8 mM se transfiere un volumen de 500 µl al nuevo tubo y se añaden 60 µl de HEPES 0,1M y 5,5 µl de EDTA 100 mM. Por último, se mide la cantidad y calidad del DNA de cada muestra por Nanodrop. Las muestras se almacenan a 20°C hasta su uso. La composición de las soluciones empleadas en la extracción de DNA se encuentra en el Anexo 1.

Los protocolos utilizados pueden consultarse en la bibliografía (14,15).

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE SOD1:

Con el objetivo de analizar la expresión génica de SOD1 en las muestras utilizamos la PCR *Real Time*. Esta técnica no solo nos permite amplificar fragmentos de DNA específicos, sino que también permite amplificar varios loci simultáneamente y cuantificarlos. El aparato utilizado es QuantStudio™ 3 (Applied Biosystems) y el programa utilizado se muestra en la Figura 4. (16)

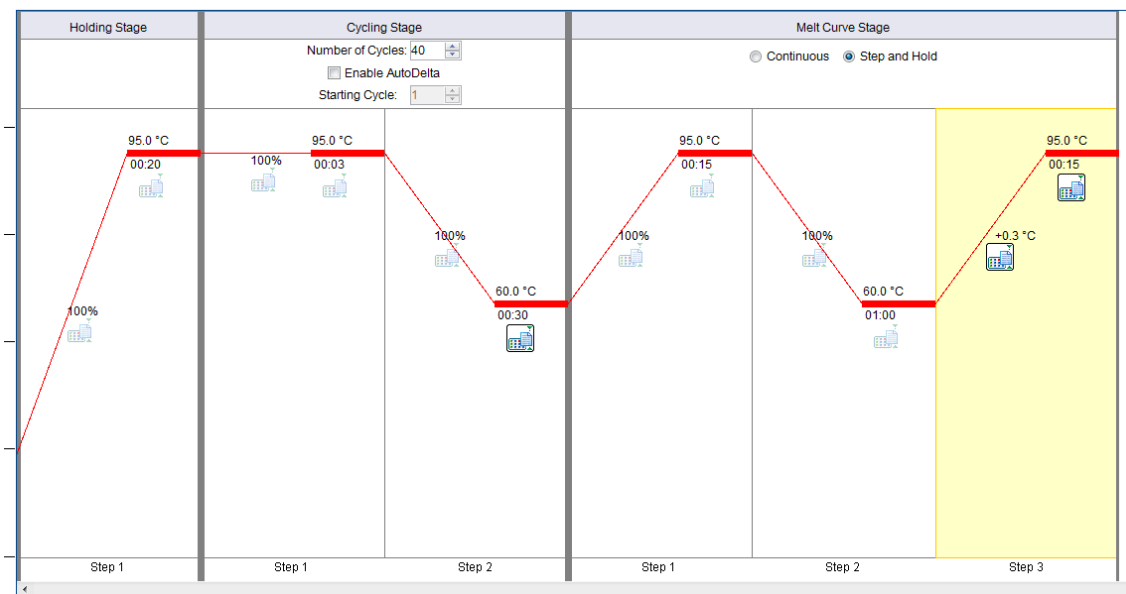


Figura 4. Programa utilizado en la PCR *Real Time*.

Se analizan las 20 muestras y un blanco, en cada caso se realiza por triplicado. Además, se preparan dos placas: una placa para estudiar la expresión de hSOD1 y una segunda placa realizar el mismo proceso, pero analizando un gen *housekeeping*, el gen Tert. Las secuencias de los primers se detallan en el Anexo 2.

En primer lugar, se prepara una solución o mix que contiene los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR, de forma que cada pocillo contendrá las cantidades determinadas de los siguientes compuestos:

- 5 µl de SYBR master mix.
- 0,2 µl de primer forward (10 µM stock).
- 0,2 µl de primer reverse (10 µM stock).
- Un volumen para 10 ng de gDNA.
- Agua hasta completar un volumen total de 10 µl.

Los pares de primers varían según el gen que se estudie. En el caso del gen hSOD1 se utilizan los primers hSOD1-F1 y hSOD1-R1. Para el gen Tert se utilizan los primers Tert-F1 y Tert-R1. En el caso del blanco no se añade DNA y se completa el volumen restante con agua.

Una vez preparada la primera placa puede introducirse en el aparato y realizarse el análisis. Después podrá seguirse el mismo procedimiento con la segunda placa, utilizando los primers adecuados en cada caso.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En primer lugar, se confirma que la distribución de los datos es normal según el test de Shapiro-Wilk. A continuación, se analizan las comparaciones de las medias de expresión génica mediante el test de t-student. Con el objetivo de determinar los cambios relativos de la expresión transcripcional en los resultados de qPCR se utilizó el método $\Delta\Delta CT$. El análisis estadístico de los

datos se realiza utilizando el *fold change* ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), tal y como se ha descrito en el artículo Livak 2001 (16). Posteriormente, se analiza la asociación entre la expresión del gen hSOD1 y las tasas de supervivencia de los ratones con el coeficiente de correlación de Pearson.

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS (versión 20, IBM, Armonk, NY) y Excel (Microsoft, 2010). Los niveles de significación se establecieron en un p-valor < 0,05.

RESULTADOS

A partir de una cantidad de 100 mg de cerebro de cada ratón se obtuvieron los resultados que aparecen en la Tabla 2. La cantidad de DNA obtenida en todos los casos fue suficiente para llevar a cabo los análisis posteriores de qPCR. Inicialmente se diluyeron las muestras en un volumen de 600 μ l. Sin embargo, más adelante se diluyeron las muestras en la mitad de volumen, para alcanzar la concentración de DNA adecuada para el estudio que se pretendía realizar. El ratio 260/280 resultante en todas las muestras fue adecuado, indicando que no se produjeron contaminaciones por proteínas. Con respecto al ratio 260/230, en algunas muestras no se alcanzó el valor adecuado por lo que se pudo producir contaminaciones por los reactivos utilizados durante el proceso de extracción. (17)

Tabla 2. Resultados obtenidos en la extracción de DNA. En las muestras que tienen un asterisco, la cantidad inicial de la muestra se diluyó en 600 μ l de NaOH 8 mM, en el resto de las muestras se utilizó un volumen de 300 μ l.

Nº de muestra	Cantidad de DNA (ng/ μ L)	260/280	260/230
4167	67,8	1,78	0,64
4297	122,8	1,81	1,15
4227	165,7	1,89	1,12
4248	134,1	1,84	1,27
4284	369,6	1,87	1,41
4271	166,5	1,84	1,12
4255	79,1	1,88	0,99
4205	93,9	1,83	0,94
4315	32,1*	1,92	0,57
4171	19,1*	1,88	0,57
4193	69,1	1,77	0,77
4298	116,4	1,68	0,79
4260	185,5	1,81	1,17
4237	104,0	1,92	1,03
4168	185,8	1,82	1,30
4318	149,5	1,85	1,22
4247	65,0	1,83	0,86
4189	164,4	1,80	1,09
4206	60,7	1,80	0,73
4285	93,5	1,81	0,72

Tras realizar el análisis de la expresión génica de las muestras mediante PCR *Real Time* o qPCR se llevó a cabo un análisis estadístico de los datos. El primer paso fue confirmar que los datos obtenidos tenían una distribución normal mediante el test de Shapiro-Wilk (se obtuvo un p-valor superior a 0,05).

Después nos interesaba comparar la expresión génica de hSOD1 entre los ratones SOD1G93A control y los que se les ha administrado en el agua de bebida el tratamiento experimental basado

en un producto con efecto antioxidante. Los datos de esta expresión aparecen representados en la Figura 5. Puede observarse que la expresión relativa de hSOD1 en los ratones control y en los ratones con el tratamiento es muy similar. Para confirmarlo se realizó un test t-Student cuyos resultados mostraban que las medias de la expresión de hSOD1 entre ambos grupos no eran significativamente diferentes.

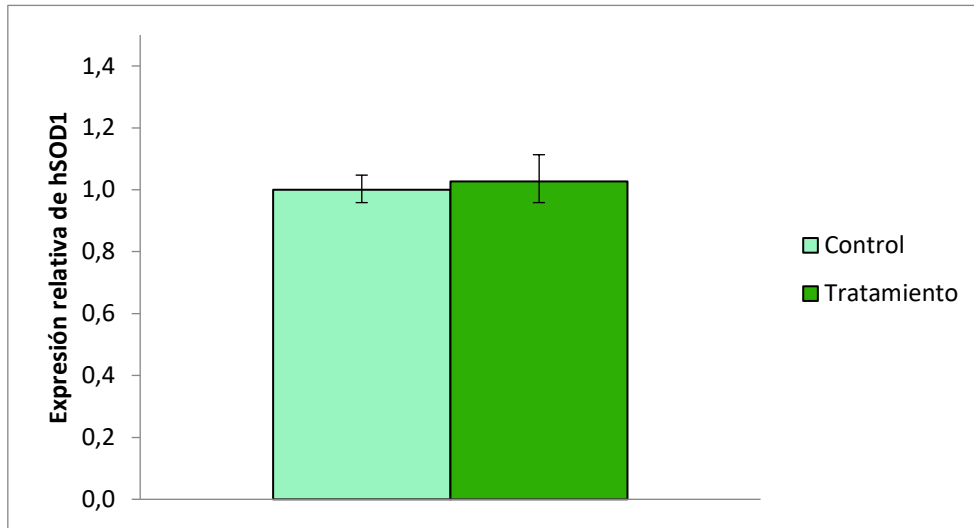


Figura 5. Comparación de la expresión génica de hSOD1 entre animales control y tratados.

Finalmente, se analizó la correlación entre la expresión génica relativa de hSOD1 y las tasas de supervivencia de los ratones. Para ello se utilizó el coeficiente de Pearson, obteniendo un p-valor de 0,16, lo que nos indica que no existe una correlación significativa entre la longevidad de los animales y la expresión génica de hSOD1, independientemente de que hayan recibido tratamiento o no. (Figura 6). La información sobre el número de animales del grupo control y del grupo al que se le aplicó el tratamiento, así como su sexo, puede consultarse en el Anexo 3.

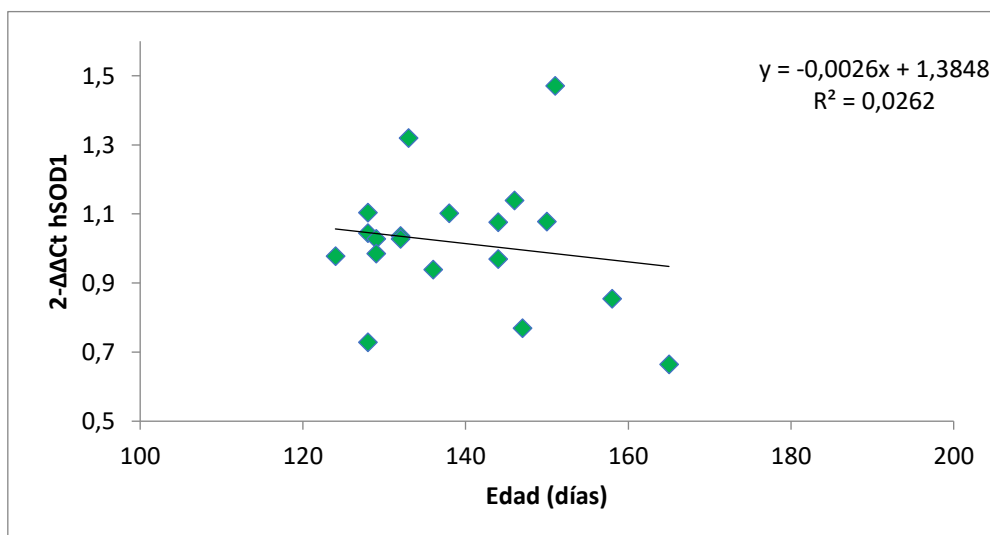


Figura 6. Correlación entre la expresión génica relativa de hSOD1 y la longevidad de los animales. Se obtuvo un p-valor de 0,16 en el test de Pearson, lo que nos indica que ambas variables no están relacionadas. El grupo control está formado por 10 ratones, con 4 machos y 6 hembras, mientras que el grupo al que se le aplica el tratamiento posee un total de 10 ratones, con 5 machos y 5 hembras.

DISCUSIÓN

Siempre resulta difícil encontrar un buen modelo animal para cualquier enfermedad, pero en el caso de una enfermedad tan compleja como la ELA es incluso más complicado. En la ELA se ven involucradas distintas vías moleculares que pueden producir alteraciones tan diversas como defectos en el transporte intracelular, alteraciones del metabolismo de RNA y proteínas, fallos en la reparación del DNA o disfunción mitocondrial. El hecho de que la ELA se vea determinada por una combinación de alteraciones genéticas y factores modificadores de la enfermedad dificulta la obtención de modelos animales adecuados.(18–20)

En un estudio de 2012 (Marka van Blitterswijk *et al.* 2012) se observó que al estudiar familias con ELA familiar se producía una penetrancia incompleta. Determinaron que se debía a que muchos pacientes presentaban mutaciones en más de uno de los genes asociados a la ELA (TARDBP, FUS / TLS, SOD1, ANG y C9orf72), lo que respalda que se trate de una enfermedad oligogénica. Esto también se observó en pacientes de ELA esporádica, aunque en menor proporción. La oligogenicidad de la ELA explicaría la diversidad que existe entre pacientes, incluso en los que poseen una misma alteración genética. Se trata de un factor a tener en cuenta a la hora de diseñar experimentos o interpretar los resultados de estos. (20)

Actualmente, la mayoría de los modelos animales utilizados posee algunos de las características observadas en los pacientes, pero el paso de los resultados obtenidos en estos modelos a la clínica resulta complicado. Un ejemplo son los ratones transgénicos con mutaciones en el gen SOD1. Son uno de los modelos animales más utilizados en esta enfermedad y han permitido investigar los mecanismos de la ELA y aplicaciones terapéuticas, pero en muchos casos no ha sido posible trasladar los hallazgos en estos modelos a los ensayos clínicos en pacientes. La oligogenicidad de la ELA se considera uno de los principales factores detrás de esta problemática, por ello sería interesante utilizar modelos animales oligogénicos. (19–22)

Sin embargo, esto no implica que los modelos animales que se han estado utilizando no sean útiles. Estos modelos, como los ratones SOD1G93A, son indispensables para mejorar la comprensión de la enfermedad y obtener información que nos permita realizar ensayos clínicos en pacientes. En los últimos años también se está combinando la utilización de modelos de animales pequeños, como *D. rerio* o *C. elegans*, y modelos de roedores. Los modelos de animales pequeños permiten identificar factores modificadores de la enfermedad que puedan estudiarse posteriormente en otros modelos animales para buscar nuevas dianas terapéuticas. (12,19,21,22)

Todo esto hace resaltar la importancia de caracterizar el modelo animal que vaya a utilizarse para cualquier enfermedad para poder asegurar que se trabaja con un fenotipo adecuado y que los datos que se obtengan sean objetivos y reproducibles.(11,19,21)

Dentro de los modelos animales de ratones en la ELA existen distintos modelos que nos permiten estudiar y comprender diferentes aspectos dentro de la enfermedad. Por ejemplo, hay diversos modelos de alteraciones de SOD1, los cuales presentan algunas diferencias en cuanto a la patología, como el tiempo de aparición de síntomas o la supervivencia de los animales. (21,22)

En la introducción de este trabajo ya se comentó que dentro del modelo animal de ratones SOD1G93A existen individuos con un menor número de copias. Esta variante posee entre 8 y 10 copias del transgén y presentan un desarrollo de la enfermedad más lento, desarrollando parálisis entre las 24 y 34 semanas de edad. Resulta un modelo especialmente interesante de cara a estudiar las primeras etapas de la enfermedad. Además, puede utilizarse para desarrollar terapias o tratamientos en las fases iniciales de la ELA.(9,11,21,23)

En nuestro caso trabajamos con el modelo de ratón SOD1G93A de alta copia, que es uno de los modelos más utilizados para estudiar la ELA causada por alteraciones de SOD1. Este modelo posee 25 copias del transgén, por lo que se cree que algunas de las características de su fenotipo podrían producirse por la gran sobreexpresión de la proteína SOD1. Los ratones desarrollan una rápida pérdida progresiva de neuronas motoras que lleva a que, alrededor de los 90 días de vida, se empiece a producir parálisis y finalmente la muerte antes de los 5 meses de edad. Es un modelo muy utilizado a nivel preclínico ya que, por un lado, permite caracterizar las distintas etapas de la progresión de la enfermedad, sobre todo en las formas más agresivas, y por otro, permite desarrollar y ensayar distintos tratamientos terapéuticos. Es por ello por lo que ha sido el modelo elegido para realizar nuestro proyecto. Y tal y como hemos comentado anteriormente, va a ser de gran importancia caracterizar los ratones que utilicemos para asegurarnos de que poseen un fenotipo adecuado.(9,11,18,21,22) A continuación, analizamos los resultados obtenidos en este ámbito.

El hecho de que el número de copias de hSOD1 entre individuos control e individuos tratados no sea significativamente diferente nos indica que el fenotipo de estos animales es constante. Esto nos interesa de cara a poder evaluar si el tratamiento posee un efecto positivo en la longevidad de los animales. Si se hubieran encontrado diferencias significativas entre ambos grupos, no podríamos valorar el efecto del tratamiento. Varios estudios previos han demostrado que el número de copias de hSOD1 que presenten los ratones SOD1G93A va a determinar la cantidad de proteína que se expresa, afectando a la supervivencia de los ratones. Se asocia un menor número de copias del transgén con una aparición de la enfermedad más tardía y una mayor longevidad. En el caso de que los animales sometidos al tratamiento mostraran un menor número de copias, esto no nos permitiría evaluar la acción del tratamiento, ya que una mayor longevidad podría deberse al tratamiento administrado o ser una consecuencia de una menor expresión de la proteína hSOD1. De cara a estudiar una enfermedad nos va a interesar que el fenotipo se mantenga constante en todos los animales.(11,21)

Tras haber confirmado que el número de copias de hSOD1 se mantiene constante en todos los ratones se analizó si la expresión génica de hSOD1 estaba relacionada con la longevidad. Se demostró que ambas variables apenas se encontraban correlacionadas. El hecho de que no haya diferencias en el número de copias de hSOD1 y que no se encuentre relacionado con la supervivencia de los animales nos permiten estudiar la influencia del tratamiento en la longevidad de los ratones en futuros experimentos incluyendo un mayor número de animales por grupo y estudiando diversos tejidos.

Estos análisis son de gran importancia antes de realizar cualquier experimento sobre la enfermedad. Se debe establecer si el fenotipo se mantiene constante y si es adecuado con respecto a nuestro experimento, ya que si no los resultados obtenidos no serían objetivos. Por tanto, siempre será relevante establecer unas condiciones de partida adecuadas a la hora de trabajar con este modelo animal.

CONCLUSIONES

ESPAÑOL

Las conclusiones a las que se llega en este trabajo son:

- El modelo de ratón SOD1G93A de alta copia utilizado en el estudio es un modelo adecuado para evaluar el efecto de una terapia experimental ya que no hay diferencias significativas en la expresión de hSOD1 entre los ratones tratados y los del grupo control.
- Cuando se trabaja con animales modelo de una enfermedad, en particular de la ELA como se ha llevado a cabo en este trabajo, es necesario asegurarse de que el fenotipo de los animales se conserva para poder llegar a obtener resultados objetivos en los estudios que se deseen realizar.
- El fenotipo conservado de hSOD1 en este modelo animal permitirá evaluar en futuros estudios las causas que influyen en una mayor o menor supervivencia de los animales y que están estrechamente ligadas al progreso neurodegenerativo inherente en la enfermedad.

INGLÉS

In this work we came to the following conclusions:

- The high copy SOD1G93A mouse model used in the study is a suitable model to evaluate the effect of an experimental therapy since there are no significant differences in the expression of hSOD1 between the treated mice and those of the control group.
- In the case animal models of a disease, in particular ALS as it has been performed in this work, it is a necessary step to confirm that the phenotype of the animals is preserved to obtain objective results in the studies that are going to be carried out.
- The conserved phenotype of hSOD1 in this animal model will enable to evaluate in future studies the causes that can influence in a longer or shorter survival of the animals and that can be closely related to the neurodegenerative progress of the disease.

BIBLIOGRAFÍA

1. Hulsiz D. Amyotrophic Lateral Sclerosis: Disease State Overview. 2018;(August):320–6.
2. Oskarsson B, Gendron TF, Staff NP. Amyotrophic Lateral Sclerosis : An Update. Mayo Foundation for Medical Education and Research; 2018;1–12.
3. Kim G, Gautier O, Tassoni-Tsuchida E, Ma XR, Gitler AD. ALS Genetics: Gains, Losses, and Implications for Future Therapies. *Neuron* [Internet]. Elsevier Inc.; 2020;108(5):822–42. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.08.022>
4. ALS – The Neurology Group [Internet]. [cited 2021 Jun 26]. Available from: <https://tnginc.org/services/als/>
5. BOE.es - BOE-A-2020-1515 Resolución de 13 de enero de 2020, de la Dirección General del Instituto de Mayores y Servicios Sociales, por la que se publica el Convenio con la Fundación Francisco Luzón, para mejorar la atención social de las personas con esclerosis lateral amiotrófica y las personas cuidadoras. [Internet]. [cited 2021 Jun 26]. Available from: https://www.boe.es/diario_boe/txt.php?id=BOE-A-2020-1515
6. Stepanow S, Honolka J, Gambardella P, Vitali L, Abdurakhmanova N, Tseng TC, et al. $\{\backslash\text{copyright}\}$ 19 9 3 Nature Publishing Group. *J Am Chem Soc* [Internet]. 2010;132(29):2517–28. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2020.213617%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2014.11.016>
7. Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, et al. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* (80-). 1994;264(5166):1772–5.
8. Costa J, Swash M, de Carvalho M. Awaji Criteria for the Diagnosis of Amyotrophic Lateral Sclerosis A Systematic Review. *Arch Neurol* [Internet]. 2012;69(11):1410–6. Available from: <http://www.archneurol.com>
9. Gurney ME. The use of transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis in preclinical drug studies. *J Neurol Sci*. 1997;152(SUPPL. 1):67–73.
10. Alexander GM, Erwin KL, Byers N, Deitch JS, Augelli BJ, Blankenhorn EP, et al. Effect of transgene copy number on survival in the G93A SOD1 transgenic mouse model of ALS. *Mol Brain Res*. 2004;130(1–2):7–15.
11. Henriques A, Pitzer C, Schneider A. Characterization of a novel SOD-1(G93A) transgenic mouse line with very decelerated disease development. *PLoS One*. 2010;5(11):3–6.
12. Morrice JR, Gregory-Evans CY, Shaw CA. Animal models of amyotrophic lateral sclerosis: A comparison of model validity. *Neural Regen Res*. 2018;13(12):2050–4.
13. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction on JSTOR [Internet]. [cited 2021 Jun 26]. Available from: <https://www.jstor.org/stable/24996713>
14. Green RS, Kit PCR, Kit RSGR. Handbook Sample & Assay Technologies QIAGEN Sample and Assay Technologies. 2009;(July).
15. Handbook M. User-Developed Protocol : Isolation of genomic DNA and / or proteins from fatty tissue samples treated with QIAzol™ Lysis Reagent Protocol 1 : Isolation of genomic DNA from the organic phase of QIAzol Reagent-lysed fatty tissue samples. :1–5.
16. Nolan T, Huggett J, Sanchez E. Good Practice Guide for the Application of Quantitative PCR (qPCR). *Natl Meas Syst*. 2013;50.
17. Bancoadn. Programa de control de calidad de ácidos nucleicos. Banco Nacional de ADN

- Carlos III (Universidad de Salamanca). Banco ADN [Internet]. 2020;1–10. Available from: www.bancoadn.org
18. Mancuso R, del Valle J, Modol L, Martinez A, Granado-Serrano AB, Ramirez-Núñez O, et al. Resveratrol Improves Motoneuron Function and Extends Survival in SOD1G93A ALS Mice. *Neurotherapeutics*. 2014;11(2):419–32.
 19. Braems E, Tziortzouda P, Van Den Bosch L. Exploring the alternative: fish, flies and worms as preclinical models for ALS. *Neurosci Lett* [Internet]. Elsevier B.V.; 2021;759(October 2020):136041. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.136041>
 20. Van Blitterswijk M, Van Es MA, Hennekam EAM, Dooijes D, Van Rheenen W, Medic J, et al. Evidence for an oligogenic basis of amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet*. 2012;21(17):3776–84.
 21. Acevedo-Arozena A, Kalmar B, Essa S, Ricketts T, Joyce P, Kent R, et al. A comprehensive assessment of the SOD1 G93A low-copy transgenic mouse, which models human amyotrophic lateral sclerosis. *DMM Dis Model Mech*. 2011;4(5):686–700.
 22. Mancuso R, Osta R, Navarro X. Presymptomatic electrophysiological tests predict clinical onset and survival in SOD1G93A ALS mice. *Muscle and Nerve*. 2014;50(6):943–9.
 23. Alexander GM, Erwin KL, Byers N, Deitch JS, Augelli BJ, Blankenhorn EP, et al. Effect of transgene copy number on survival in the G93A SOD1 transgenic mouse model of ALS. 2004 [cited 2021 Jun 19]; Available from: www.elsevier.com/locate/molbrainres

ANEXOS

ANEXO 1. SOLUCIONES EMPLEADAS

Genotipado:

- Tris 1M: 60,6 g Tris Base, 500 ml H₂O mQ.
- NaOH 50 mM: 2 g hidróxido de sodio, 1 L H₂O mQ.
- TBE 1x: 100 ml TBE 10x, 900 ml H₂O destilada.

Extracción DNA/RNA:

- Etanol 75%: 37,5 ml etanol, 12,5 ml H₂O mQ.
- Solución de citrato de sodio 0,1M en 10% de etanol: 2,941 g citrato de sodio, 90 ml H₂O mQ, 10 ml etanol.
- NaOH 8 mM: 16 mg NaOH, 50 ml H₂O mQ.
- HEPES 0.1 M: 238,3 mg HEPES, 10 ml H₂O mQ.
- EDTA 0.1 M: 37,22 mg EDTA, 1 ml H₂O mQ.

ANEXO 2. SECUENCIA DE LOS PRIMERS UTILIZADOS EN LAS PCR

Nombre	Secuencia
OIMR42 (IL-2 F)	CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT
OIMR43 (IL-2 R)	GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC
OIMR113 (hSOD1 F)	CATCAGCCCTAATCCATCTGA
OIMR114 (hSOD1 R)	CGCGACTAACAATCAAAGTGA
Tert-F	ATGTTTGGTTCCATTGTGTTCTC
Tert-R	GGGACAATTCATAGCAGCTTTATT
hSOD1-F	TGTGCACCTACGATTGAGAAC
hSOD1-R	GCCAATTCGGTGTAATGGAAAC

ANEXO 3. CARACTERÍSTICAS DE LOS INDIVIDUOS DE LOS GRUPOS CONTROL Y DE TRATAMIENTO

Nº identificativo	Sexo	Grupo al que pertenece	Longevidad (días)
OOGA4167	Macho	Control	128
OOGA4297	Macho	Control	132
OOGA4227	Macho	Control	136
OOGA4248	Macho	Control	138
OOGA4284	Hembra	Control	127
OOGA4271	Hembra	Control	128
OOGA4255	Hembra	Control	129
OOGA4205	Hembra	Control	144
OOGA4315	Hembra	Control	146
OOGA4171	Hembra	Control	150
OOGA4193	Macho	Tratamiento	128
OOGA4298	Macho	Tratamiento	132
OOGA4260	Macho	Tratamiento	147
OOGA4237	Macho	Tratamiento	151
OOGA4168	Macho	Tratamiento	158
OOGA4318	Hembra	Tratamiento	124
OOGA4247	Hembra	Tratamiento	129
OOGA4189	Hembra	Tratamiento	133
OOGA4206	Hembra	Tratamiento	144
OOGA4285	Hembra	Tratamiento	165