



Facultad de Veterinaria  
**Universidad** Zaragoza



# Trabajo Fin de Grado

ESTUDIO DE EXPRESIÓN GÉNICA DE MARCADORES  
MUSCULARES EN UN MODELO ANIMAL DE ESCLEROSIS  
LATERAL AMIOTRÓFICA

**Autor**

MARTA MÍNGUEZ RUIZ

**Director/es**

ANA CRISTINA CALVO ROYO

JANNE M. TOIVONEN

Facultad de Veterinaria

2015

---

# Índice

<b>1. Resumen.....</b>	<b>2</b>
Abstract .....	3
<b>2. Introducción .....</b>	<b>4</b>
La esclerosis lateral amiotrófica.....	4
El modelo animal.....	7
Los microRNAs.....	9
Breve introducción a los factores de regulación miogénica. ....	11
<b>3. Justificación y objetivos.....</b>	<b>11</b>
<b>4. Material y métodos.....</b>	<b>12</b>
Modelo animal de ELA .....	12
Extracción de RNA y Retrotranscripción .....	12
PCR a tiempo real.....	15
Análisis estadístico de los datos.....	17
<b>5. Resultados y discusión.....</b>	<b>17</b>
<b>6. Conclusiones.....</b>	<b>20</b>
Conclusions.....	21
<b>7. Valoración personal.....</b>	<b>22</b>
<b>8. Bibliografía.....</b>	<b>23</b>

# 1. Resumen

---

Estudio de expresión génica de marcadores musculares en un modelo animal de esclerosis lateral amiotrófica.

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) es una enfermedad neuromuscular de carácter fatal que se caracteriza por una degeneración gradual de las motoneuronas y una progresiva atrofia muscular. El modelo animal que más se aproxima al progreso degenerativo en humanos es el ratón transgénico que sobreexpresa la isoforma de la SOD1 humana en la posición mutada G93A (SOD1-G93A). El objetivo fundamental en este trabajo se ha centrado en el análisis de la expresión de los factores que controlan el potencial regenerativo del músculo esquelético. Para la consecución de este objetivo se cuantificó la expresión génica del microRNA-206 (miR-206), en el músculo extensor digital largo de ratones transgénicos SOD1G93A. La bibliografía muestra que el miR-206 retrasar la progresión de la enfermedad y promueve la regeneración de la sinapsis neuromuscular, y de factores de regulación miogénica como miogenina (*Myog*) y *Myod1*, que regulan el crecimiento y la regeneración muscular. Por este motivo se analizó también la expresión de *Myog* y *Myod1* para estudiar su posible relación con los niveles de miRNA-206 en el músculo esquelético de ratones transgénicos SOD1-G93A.

Los niveles de expresión génica se cuantificaron mediante la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real, utilizando para ello sondas Taqman. Los animales sanos de la misma camada se utilizaron como control. La significación estadística se estableció para un valor de  $p < 0.05$  en los test t de student realizados.

Los resultados muestran un incremento significativo de los niveles del miR-206 en el músculo EDL, y de los niveles de expresión de *Myog* y *Myod1* en músculo esquelético de ratones transgénicos SOD1-G93A con respecto a animales sanos. Estos resultados refuerzan la hipótesis de que el músculo esquelético preserva en cierto modo su capacidad regenerativa a pesar de la atrofia muscular característica de la enfermedad en el estadio terminal.

# Abstract

---

Study of gene profile expression of muscle markers in an animal model of Amyotrophic Lateral Sclerosis.

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a devastating neuromuscular disease of adult onset, which is characterized by a progressive degeneration of the motor neurons and muscle atrophy. The animal model that resembles the human disease is the transgenic mice that overexpressed the human isoform of SOD1, mutated in the position 93 (SOD1-G93A). The main aim of this study is focused on the analysis of the expression of the factors that control the regenerative capacity in the skeletal muscle. For this purpose, the gene expression profile of microRNA-206 (miR-206) in the *extensor digitorum longus*, EDL, was analyzed in transgenic SOD1-G93A mice. The bibliography shows that miR-206 ameliorates the progresión of the disease and prompts the regeneration of the neuromuscular synapsis and myogenic regulatory factors, such as miogenin (*Myog*) and *Myod1*, which regulate the growth and the muscle regeneration by activating relevant genes in the muscle. Consequently, the gene expression of *Myog* y *Myod1* was also analyzed to study their possible crosstalk with miRNA-206 levels in the skeletal muscle from transgenic SOD1-G93A mice.

The gene expression levels were quantified by quantitative real time PCR, using Taqman probes. Litter-mate wild type animals were used as control. Statistical significance was established at  $p < 0.05$  in Student t Tests.

The results suggested a statistically significant increase in the miR-206 levels in the EDL muscle and in *Myog* y *Myod1* levels in the skeletal muscle from transgenic SOD1-G93A mice respect to wild type mice. These findings reinforce the hypothesis that skeletal muscle preserves in some way its regenerative capacity in spite of the muscle atrophy which is characteristic of the disease, especially at terminal stages.

## 2. Introducción

---

### La esclerosis lateral amiotrófica

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA), se trata de un desorden neurodegenerativo que se caracteriza por la pérdida idiopática de motoneuronas superiores e inferiores localizadas en la corteza motora, tronco del encéfalo y en la médula espinal, lo que genera debilidad y atrofia muscular que concluye en parálisis y muerte por fallo respiratorio.<sup>1</sup> Descrita por primera vez por Jean Martin Charcot en 1869, también se conoce con el nombre de enfermedad de motoneurona (Motor neurone disease, MND), después de la descripción dada por Brain y Walton en 1969, o enfermedad de Lou Gehrig, en honor al jugador de béisbol que falleció en 1941.<sup>1-3</sup> Etimológicamente, el término “esclerosis lateral” hace alusión al endurecimiento de las astas anteriores y laterales de los tractos corticoespinales por la degeneración de las motoneuronas localizadas en estas áreas y la gliosis, y el término “amiotrófica” refleja la atrofia de las fibras musculares causante de la debilidad y pérdida de masa muscular y de las fasciculaciones.<sup>4</sup> La ELA se considera una enfermedad rara ya que presenta una incidencia de 1/50.000 casos y una prevalencia de 1/10.000 casos por año.<sup>5</sup>

Epidemiológicamente la esclerosis lateral amiotrófica puede clasificarse en dos formas, la más frecuente de presentación es la forma esporádica que comprende al 90-95% de los casos, la forma minoritaria es la familiar que engloba al 5-10% restante, de los cuales aproximadamente un 20% de los casos presentan un patrón de herencia autosómico dominante de mutaciones en el gen Cu-Zn superóxido dismutasa, que codifica para la enzima superóxido dismutasa soluble 1 (SOD1), a su vez el 2% de los pacientes aparentemente esporádicos también presentan mutaciones en el gen SOD1.<sup>1,6-7</sup> Existen 149 mutaciones en la cadena polipeptídica de la enzima SOD1 relacionadas con el desarrollo de la enfermedad.<sup>8</sup> La SOD1 es una metaloenzima antioxidante conformada por 153 aminoácidos, cuya función es proteger al organismo del acúmulo de radicales libres, así detoxifica especies reactivas de oxígeno (ROS), como puedan ser el anión superóxido ( $O_2^-$ ) ó hidroxilo ( $OH^-$ ) generando peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), que es finalmente escindido en oxígeno ( $O_2$ ) y agua ( $H_2O$ )<sup>6,7</sup>. Mutaciones en esta enzima pueden causar una perturbación en el metabolismo del  $O_2$  y una ganancia tóxica de función de la enzima, ya que su centro activo es accesible a sustratos atípicos, lo que puede conducir a un aumento de radicales libres, provocando finalmente un estrés oxidativo o la liberación del cobre y el zinc que conforman su centro activo y que son elementos neurotóxicos.

La edad media de presentación de la forma esporádica se presenta en torno a los 60 años, comenzando sólo un 5% de los casos antes de los 30 años. La forma familiar de la enfermedad suele presentarse aproximadamente una década antes que la esporádica, hacia los 50 años y tiene una esperanza de vida más corta que la forma esporádica, con una media de supervivencia entre los 3 y 5 años desde el inicio de los síntomas, dependiendo de la forma clínica de presentación, ya bien sea bulbar o espinal.<sup>1</sup>

El comienzo de la enfermedad suele ser focal, iniciándose en las extremidades superiores o inferiores con una progresión normalmente asimétrica, cursando de forma diferente en cada parte del cuerpo.

Se distinguen dos formas de ELA según la presentación clínica, la “forma clásica o espinal” y la “forma bulbar”. La primera la presentan aproximadamente dos tercios de los enfermos de ELA esporádico y los primeros síntomas se caracterizan por fasciculaciones, calambres, hiperreflexia y espasticidad como resultado de la disfunción de las motoneuronas superiores y debilidad, atrofia muscular y parálisis fruto de la afectación de las motoneuronas inferiores, viéndose por tanto gravemente afectada la destreza manual y la marcha. En la “forma bulbar” primeramente se produce disartria en el lenguaje, disfagia, sialorrea, y debilidad facial bilateral que afecta a la parte inferior del rostro, dándose también de forma frecuente síntomas pseudobulbares como bostezo excesivo y labilidad emocional con accesos de risa y llanto incontrolables.<sup>1,3,5</sup> Cabe destacar que en ambas formas se va a preservar la integridad de los músculos oculomotores y de aquellos que conforman los esfínteres urinarios.<sup>7</sup>

Se desconoce el mecanismo molecular exacto que causa la degeneración motoneuronal en la ELA. En diversas publicaciones se ha llegado a la conclusión de que más bien se trata de una interacción compleja entre múltiples mecanismos celulares patológicos no excluyentes entre sí.<sup>1,7,9-10</sup> (Figura 1). Entre los más citados se encuentran los factores genéticos, ya que el 20% de los casos de ELA familiar y algunos de ELA esporádica muestran mutaciones en el gen *SOD1*. Se estima que dichas alteraciones serían las causantes de la enfermedad, apuntando al estrés oxidativo como una causa potencial de la etiopatogénesis de la enfermedad. Mutaciones en otros genes como por ejemplo el *TARDBP*, *FUS/TLS* y el reciente *C9ORF72*, también han sido relacionadas con la patogénesis de la enfermedad.<sup>1,11,12</sup> Otra de las hipótesis que se barajan es la excitotoxicidad inducida por el glutamato, ya que el incremento extracelular de los niveles de glutamato sobreestimula a las células nerviosas causando la degeneración y muerte de las mismas. En condiciones normales, este aminoácido es sintetizado y liberado por la neurona presináptica a la hendidura sináptica y tras interaccionar con sus receptores en la membrana postsináptica es recaptado por transportadores específicos (EAAT), localizados principalmente

en los astrocitos en los que es degradado y puesto de nuevo a disposición de la neurona presináptica.

En pacientes con ELA la recaptación de glutamato se ve disminuida debido a la pérdida selectiva de transportadores astrogiales de tipo EAAT2 (principal transportador de glutamato que además está ampliamente distribuido por el sistema nervioso central), lo que provocará una permanente activación de los receptores del aminoácido, que conducirá a que se dé una entrada masiva de calcio al citoplasma que la célula no será capaz de almacenar y lo que provocará la activación de rutas apoptóticas. Además la alteración de la enzima antioxidante SOD1 induce daño oxidativo en el transportador EAAT2, por lo que el transporte de glutamato se ve aún más disminuido.<sup>7</sup>

La disfunción mitocondrial también es potenciada en el proceso neurodegenerativo de la ELA, debido a que las mitocondrias son muy vulnerables a la excitotoxicidad, ya que son las principales encargadas de tamponar los niveles intracelulares de calcio. Esta hipótesis está respaldada por el hallazgo de alteraciones morfológicas y bioquímicas en las mitocondrias de pacientes con ELA y también en ratones transgénicos modelo de la enfermedad con SOD1 mutada.<sup>13-15</sup> Adicionalmente, se ha descrito una reducción de la actividad del transporte axonal de moléculas y orgánulos, tanto en su vía anterógrada como retrógrada en pacientes y ratones modelo de la enfermedad, proceso esencial para el correcto funcionamiento y supervivencia de las motoneuronas.<sup>16-19</sup> Estas perturbaciones en el transporte axonal podrían reflejarse en una pérdida del patrón estructural de los neurofilamentos,<sup>1</sup> por lo que la etiopatogenia de la enfermedad también se podría explicar mediante alteraciones a este nivel.

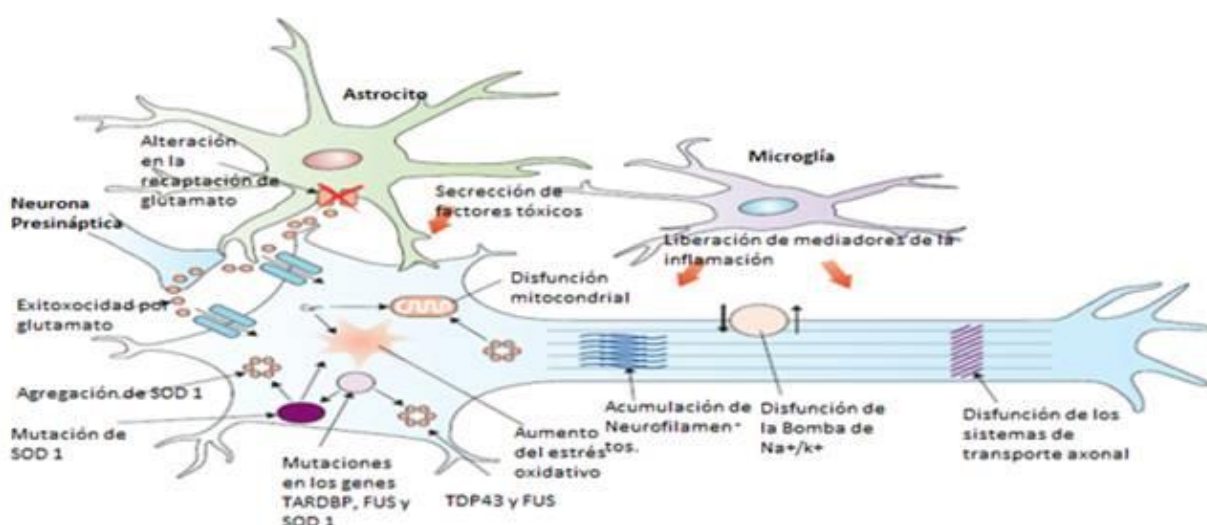


Figura 1: Resumen de los posibles mecanismos etiopatogénicos de la ELA. (www.efisioterapia.net)<sup>20</sup>

Pese a que cabría pensar que la ELA proviene de un daño exclusivo a las motoneuronas, diversos estudios han demostrado que existe una implicación de células nerviosas no neuronales, como por ejemplo, el músculo esquelético. Se ha demostrado que la supresión parcial de la expresión de SOD1 mutante en el tejido muscular no es suficiente para retrasar el progreso de la enfermedad en ratones transgénicos, lo que sugiere que, o bien, restos residuales de la enzima mutada son suficientes para seguir manifestando el fenotipo patológico, o que las propiedades tóxicas de la enzima mutada son independientes de sus niveles de expresión.<sup>21,22</sup> Una de las hipótesis sobre la enfermedad señala que la expresión ubicuitaria de SOD1 en ratones transgénicos primero causa atrofia muscular, seguida de la alteración de la unión neuromuscular, causando posteriormente una degeneración axonal retrógrada y provocando la muerte de la motoneurona.<sup>7</sup> Este patrón de progresión retrógrado sugiere la posibilidad de que ciertas anomalías musculares puedan preceder a la muerte neuronal.

## El modelo animal

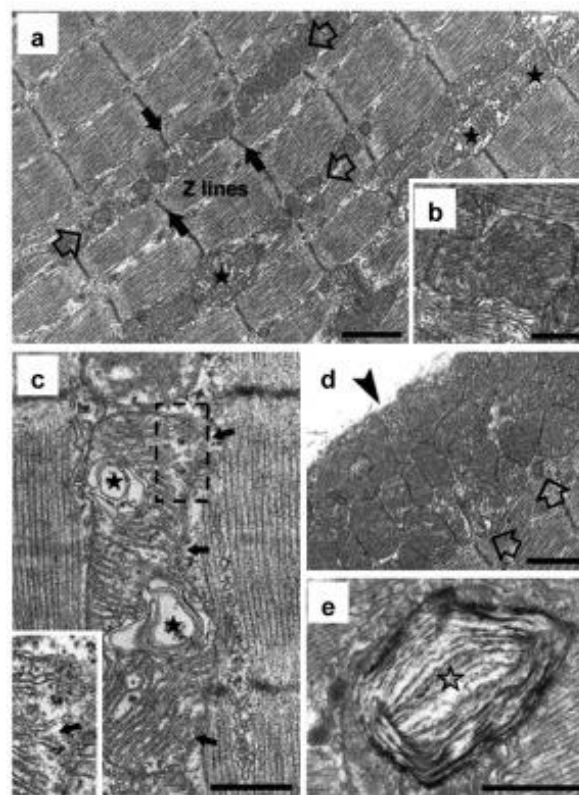
Una vez fueron descubiertas las mutaciones en la enzima SOD1 asociadas al padecimiento de esta enfermedad, se crearon animales transgénicos, es decir modificados genéticamente mediante mutación, sobreexpresión o interrupción de los genes que están más comúnmente alterados en la forma familiar de la ELA humana y que actualmente se consideran como los mejores modelos *in vivo* de la ELA humana. De todos los modelos animales existentes en la actualidad, el más utilizado y mejor caracterizado es el que sobreexpresa la enzima humana mutada superóxido dismutasa 1 (SOD1). Dentro de este modelo se han desarrollado múltiples cepas de ratones que portan la SOD1 alterada pero con diferentes mutaciones y/o número de copias del transgén. Las diferentes alteraciones van a originar variaciones tanto en la estabilidad del enzima como en su actividad dismutasa. De todas estas alternativas una de las más utilizadas como modelo de ELA, debido a que es la que más se aproxima al proceso degenerativo en humanos, es aquella que sobreexpresa la isoforma mutada de la SOD1 en la posición G93A, SOD1-G93A, que es el modelo animal que se ha utilizado para la realización del presente trabajo.<sup>23-24</sup>

En este modelo animal se han descrito varias anomalías a nivel citopático como vacuolizaciones intracitoplasmáticas motoneuronales, fragmentación del aparato de Golgi y presencia de agregados neuronales de la enzima SOD1 mutada.<sup>25-28</sup> La sobreexpresión del enzima SOD1 mutado restringida únicamente al músculo esquelético es suficiente para inducir una severa atrofia muscular asociada con una reducción significativa de la fuerza muscular, desorganización



de los sarcómeros y del sistema sarcotubular, además de cambios significativos en la morfología y disposición mitocondrial.<sup>21</sup> (Figura 2).

En este modelo animal se puede seguir el progreso de la enfermedad, según las siguientes etapas claramente definidas: etapa asintomática (40 días), etapa sintomática temprana (alrededor de 55 días), cuando se detectan los primeros déficits motores, etapa sintomática tardía (alrededor de 90 días), momento en el que se manifiestan los primeros temblores, debilidad muscular en una o varias de las extremidades, y pudiendo ir acompañados de cierto grado de paresis, y finalmente etapa terminal (alrededor de los 120 días), etapa en la que se han recogido las muestras de este estudio y que se caracteriza por un estado severo de cuadriplejía.

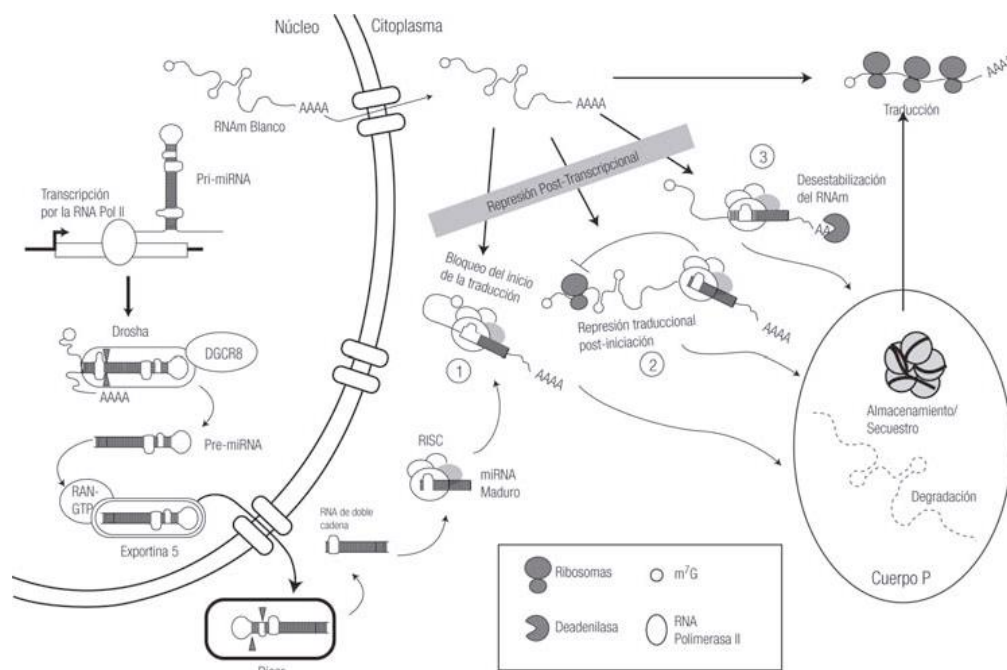


**Figura 2: Microscopía electrónica de músculo SOD1-G93A EDL.** A. Miofibrillas (flechas negras), las mitocondrias se agrupan en filas longitudinales entre las miofibrillas (flechas vacías) y se presentan hinchadas con anomalías morfológicas y de mayor tamaño (estrellas). B. Mitocondria de muy incrementado tamaño. C. En varios casos las mitocondrias presentan vacuolizaciones (estrellas) y perturbaciones en la membrana externa (detalle ampliado del trazado discontinuo). E. formaciones en las mitocondrias que se asemejan a mielina (estrella). D. Grandes grupos de mitocondrias situadas justo debajo del sarcolema (flechas vacías). Barras: A y D, 1 micras; B, C y E 0,5 micras. (Dobrowolny et al., 2008).<sup>21</sup>

## Los microRNAs

Los microRNAs (miRNA) son una clase de RNA de corta longitud, de entre 19 y 25 nucleótidos, que se transcriben a partir de genes de DNA pero que no codifican para proteínas. Su función consiste en regular la expresión génica pos-transcripcional, uniéndose por apareamiento imperfecto a sus RNA mensajeros (mRNA) diana, bloqueando la síntesis de proteínas por desestabilización del mRNA y represión traduccional. Los miRNA juegan un papel determinante en procesos de diferenciación celular y en la regulación de varias funciones celulares, estando involucrados en procesos básicos como el metabolismo o el sistema inmunológico. En condiciones de enfermedad su expresión suele verse frecuentemente alterada.<sup>29,30</sup>

La mayoría de los genes de miRNA se ubican en regiones intergénicas y tienen su propio promotor y elementos reguladores. La biosíntesis de los miRNA comienza en el núcleo celular con la génesis de moléculas precursoras (pri-miRNA), fruto de la transcripción de los miRNA por la RNA polimerasa II. El pri-miRNA que consta de un casquete (7-metil-guanosina) en el extremo 5' y una cola poli (A) en el extremo 3', se autocomplementa formando una estructura de tallo y bucle de unos 80 nt, que será procesado por la proteína Drosha para generar un precursor más pequeño, pre-miRNA, de aproximadamente 65 nt de longitud, con una estructura secundaria característica de "horquilla". El pre-miRNA es transportado al citoplasma, donde la enzima RNasa III Dicer corta el tallo y bucle del pre-miRNA, generando un RNA dúplex, constituido por una cadena de miRNA maduro y una complementaria (miRNA/miRNA\*) de unos 22 nt de longitud. El miRNA maduro resultante se incorpora a un conglomerado proteico, complejo silenciador inducido por RNA (RISC) y se degrada la cadena complementaria (miRNA\*), conservándose la cadena antisentido o guía (miRNA), que es la que va a identificar los mRNA blanco para que el RISC actúe sobre ellos, bloqueando la síntesis de proteínas, bien por la inhibición de la traducción o por la desestabilización del mRNA. Los mRNA blanco se recluirán en los cuerpos-P, regiones del citoplasma celular con altas tasas de degradación del mRNA, para su almacenamiento o degradación, aunque podrán ser liberados y traducidos en condiciones de estrés<sup>30</sup> (Figura 3).



**Figura 3: Biogénesis de los miRNA y mecanismos de regulación de expresión génica.** (Lugo-Trampe, Á., del Carmen Trujillo-Murillo, K., 2009).<sup>30</sup>

El nivel de expresión de los miRNA, que se puede evaluar mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR), puede verse frecuentemente alterado en condiciones de enfermedad como son el cáncer, patologías metabólicas y cardiovasculares y desordenes del sistema nervioso central.<sup>31-33</sup> Además se ha descrito que los miRNA son secretados por varios tipos celulares, siendo además estables en los fluidos corporales, al contrario que la mayoría de mRNAs.<sup>34-37</sup> Por todas estas características los miRNA han suscitado gran interés como potenciales biomarcadores de enfermedad mínimamente invasivos y económicamente rentables.

Diversos miRNA como miR-1, miR-133, miR-214, miR-181 y miR-206, se expresan de forma prácticamente exclusiva en el músculo esquelético. En este trabajo se ha estudiado en concreto el comportamiento de miR206 debido a que se ha comprobado que retrasa la progresión de la enfermedad y promueve la regeneración de la sinapsis neuromuscular en el modelo ratón G93A.<sup>37</sup> El mecanismo por el cual miR206 fomenta una respuesta compensadora parcialmente exitosa a la denervación, es mediante el bloqueo de la actividad de la histona deacetilasa 4 (HDAC4), que inhibe la expresión de *fibroblast growth factor binding protein 1* (FGFBP1) encargada de mantener la integridad y plasticidad de la unión neuromuscular.

## Breve introducción a los factores de regulación miogénica.

En estrecha relación con miR-206 se encuentran los factores de regulación miogénica (MRFs, myogenic regulatory factors). Los MRFs son factores de transcripción que regulan genes relacionados con el músculo (creatin quinasa, cadena ligera de la miosina, receptor de acetil colina, entre otros). Por otro lado, los MRFs también activan la transcripción y diferenciación de mioblastos en miotubos funcionales. En presencia de daño muscular, denervación o en condiciones de ejercicio físico intenso, de forma similar a miR-206, los MRFs activan la transcripción de genes implicados en la proliferación y diferenciación de los mioblastos.<sup>38</sup> En particular, se ha descrito en fibroblastos in Vitro que Myod1 es capaz de activar la expresión de miR-206 para modular la expresión génica a nivel muscular.<sup>39</sup>

## 3. Justificación y objetivos.

---

El músculo esquelético es uno de los tejidos diana para el estudio de la ELA. La creciente relevancia del músculo esquelético en la patología de la enfermedad y la posibilidad de poder trasladar los resultados del modelo animal a muestras humanas más fácilmente que en el caso del tejido nervioso, potencian la idoneidad de este tejido para ser objeto de estudio. El objetivo general que se propone se basa en estudiar la expresión génica de marcadores diana en músculo esquelético en ratones transgénicos SOD1-G93A de 120 días.

Para la consecución de este objetivo general, se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- 1.- Analizar la expresión de miR-206, estrechamente relacionada con el proceso regenerativo del músculo esquelético característico de la ELA. Las muestras para el estudio de este marcador génico se tomaron a partir del músculo extensor digital largo (EDL), músculo constituido por fibras de contracción rápida en su mayoría del tipo IIB y IIDB. Es interesante destacar que en la ELA las motoneuronas que inervan este tipo de fibras, con metabolismo glucolítico, se muestran más vulnerables.
- 2.- Analizar la expresión génica de dos factores de regulación miogénica (*Myog*) y *Myod1*, en ratones transgénicos SOD1-G93A de 120 días. Las muestras para el estudio de estos dos marcadores génicos se tomaron a partir de músculo esquelético de los animales.

## 4. Material y métodos

---

### Modelo animal de ELA

El ratón transgénico B6SJL-Tg (SOD1-G93A) 1Gur/J (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) es el modelo mejor caracterizado para el estudio de la ELA. Este ratón es portador de una mutación G93A, que consiste en la sustitución de la glicina por alanina en el residuo 93 en el gen humano de la superóxido dismutada 1 (SOD1). Los animales fueron alojados bajo un ciclo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad, a una temperatura comprendida entre 21-23°C con una humedad relativa del 55%, disponiendo de agua y comida *ad-libitum*. Los animales transgénicos fueron mantenidos cruzando machos hemicigotos SOD1-G93A con hembras B6SJL de fenotipo salvaje. La descendencia se identificó mediante PCR amplificando DNA extraído de la cola como se describe en el protocolo del Jackson Laboratory para genotipar ratones transgénicos hSOD1.<sup>40</sup> Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité Ético de la Universidad de Zaragoza y se siguieron las guías internacionales para el uso de animales de laboratorio.

### Extracción de RNA y Retrotranscripción

Los animales se sacrificaron mediante inhalación de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) a los 120 días de edad. Seguidamente, se procedió a la disección del músculo extensor digital largo (EDL) mediante el material quirúrgico apropiado y debidamente esterilizado. Una vez extraído el EDL, se conservaron las muestras a -80°C hasta su uso posterior.

Los dos procedimientos que se describen a continuación se llevaron a cabo en condiciones estériles y libres de RNasas, utilizando RNasa Zap (Life Technologies).

- **Extracción de RNA**

Para la extracción del microRNA, cada una de las 10 muestras obtenidas de tejido muscular fue procesada de forma individual. Para ello se adicionaron 0.5 ml de QIAzol lysis reagent (Qiagen, Cat# 79306) y una bola homogeneizadora de acero inoxidable a cada una de las muestras y estas se procesaron con la ayuda del TissueLyser LT a 50Hz durante 2 minutos. Con este equipo lo que

se consigue es la disrupción del tejido muscular para así proceder a la liberación del RNA por medio de una agitación a gran velocidad con las bolas homogeneizadoras de acero inoxidable, las cuales golpean y disgregan las muestras. La coexistencia en el tiempo del golpeteo y la acción de disgregación va a favorecer la homogenización de las muestras, facilitando así el proceso de purificación posterior.

Seguidamente, para eliminar los restos celulares se centrifugó a 12.000 g, durante 1 minuto a temperatura ambiente y el sobrenadante, que se consideró que fuera para todas las muestras de 450 µl, se transfirió a un tubo nuevo de 1.5 ml de capacidad, siendo el RNA purificado mediante el kit Ditect-zol RNA miniprep (Zymo Research, Cat# R2052), en el cual la extracción del RNA se realiza por la adhesión del mismo a una columna. Así para cada una de las muestras se añadieron 450 µL de etanol absoluto y se mezcló con vórtex. La solución se aplicó directamente en la columna y se centrifugó a 12.000 g, durante 1 minuto. De esta forma, es como el RNA queda adherido a la columna.

Se desechó el eluido y se transfirió la columna a un nuevo tubo colector. Sobre esta columna se añadieron 400 µL de la solución de prelavado y posteriormente se centrifugó en las mismas condiciones que en el paso anterior. Siendo repetida esta etapa una vez más.

Se adicionaron 700 µL de la solución de lavado, y se volvió a centrifugar a 12.000 g, durante 1 minuto, desechando finalmente el eluido. De esta forma se consiguieron eliminar las impurezas de la columna. Para secar la columna se procedió a su centrifuga en un tubo vacío a 12.000 g, durante 2 minutos. Después se transfirió cuidadosamente la columna a un tubo eppendorf nuevo. Para eluir el RNA, se adicionaron 50 µL de agua libre de nucleasas y se realizó una última centrifuga a 14.000 g, durante 1 minuto, a temperatura ambiente.

Para determinar la concentración de RNA total, se realizó un análisis espectrofotométrico con el equipo NanoDrop ND- 1000, donde se midió la absorbancia para cada muestra a 260 nm utilizando como blanco el agua libre de nucleasas en la que se disolvió el RNA extraído. Para definir la pureza de las mismas, se consideró que la relación de absorbancia A260/A280 fuera aproximadamente igual a 2.

- **Retrotranscripción de miRNA para la obtención de cDNA**

Una vez realizada la extracción del miRNA, se procedió a la realización de la retrotranscripción para la obtención de cDNA.

Cada muestra de RNA muscular se diluyó para conseguir una concentración final para todas ellas de 5 ng/μl.

La retrotranscripción se llevó a cabo utilizando el kit TaqMan MicroRNA Reverse Transcription (Life technologies, Cat# 4366597). Se seleccionaron cebadores para el miR-206 (Cat# 4427975, ensayo 000510) y para los normalizadores snoRNA-202 (Cat# 4427975, ensayo 001232) y snoRNA-234 (Cat# 4427975, ensayo 001234). En la mezcla de reacción se añadieron 1.5 μl de la mezcla de cebadores, 1.5 μl de tampón retrotranscripción (10X RT Buffer), 0.15 μl de mezcla desoxirribonucleótidos (dNTP mix), 0.19 μl de inhibidor de RNasas, 1 μl de transcriptasa reversa Multiscribe y 4.66 μl de agua libre de DNasas y RNasas. A estos 9 μl les fueron adicionados 6 μl de la muestra de RNA muscular diluida, para conseguir un total de 30 ng de RNA de partida (volumen total de reacción= 15 μl).

El programa de retrotranscripción que se siguió fue el siguiente: 16°C 30 min., 42°C 30 min., 85°C 5 min., y finalizar a 4°C.

- **Extracción y retrotranscripción de mRNA para la obtención de cDNA**

Las muestras de músculo esquelético de ratones transgénicos SOD1-G93A y de ratones wild type, sanos, se extrajeron a la edad de 120 días (nº total de animales= 6).

El RNA total de cada muestra fue extraído de acuerdo con el protocolo de *TRIzol Reagent* (Invitrogen), Tras la pulverización con nitrógeno líquido se añadió 500 μl de TRIzol Reagent y se continuó pulverizando la mezcla con nitrógeno. Posteriormente y tras trasvasar la muestra a un eppendorf se procedió a la homogeneización de la muestra (*Ultra-Turrax T.10 IKA*). Tras centrifugar a temperatura ambiente durante 10 minutos a 13.000 rpm para eliminar los posibles restos de tejido no digerido y de contaminantes, se recogió el sobrenadante en el que estaba contenido el RNA. A éste se le añadió 150μl de cloroformo, agitando fuertemente y tras una incubación de 10 minutos a temperatura ambiente se realizó una centrifugación a 12.000 g a 4°C durante 15 minutos. Se recogió la fase acuosa donde había quedado solubilizado el RNA, separado de lípidos (fase orgánica) y proteínas y DNA (interfase). Para la precipitación del RNA se añadió 250μl de isopropanol frío y se incubó durante 10 minutos, sedimentándolo posteriormente mediante una centrifugación de 20 minutos a 4°C y 10.000g. Tras eliminar el isopropanol se lavó y rehidrató el RNA con 500μl etanol frío al 75% y se repitió la centrifugación durante 5 minutos. Por último se dejó secar la muestra al aire y se resuspendió el RNA en 50 μl de H<sub>2</sub>O-DEPC para evitar la posible presencia de RNasas. Posteriormente, se eliminó el DNA



genómico del RNA total siguiendo el protocolo del kit *Turbo DNA-free* (Ambion). A continuación se llevó a cabo la retrotranscripción mediante el kit *SuperScript<sup>TM</sup> First-Strand Synthesis System kit* (Invitrogen), partiendo de 1µg de RNA, obteniendo DNA complementario (cDNA) en un volumen final de 21µl.

## PCR a tiempo real

Para cuantificar la expresión de miR-206, se utilizaron las sondas individuales de “TaqMan® miRNA assays” (Life Technologies, Cat# 4427975) para miR-206 y los normalizadores snoRNA-202 y snoRNA-234. La expresión de mRNA se cuantificó mediante sondas TaqMan® Gene Expression Assays para Myog (Mm00446194\_m1) y Myod1 (Mm00440387\_m1) y los normalizadores Gapdh y Actb (4352933E, 4352932E, respectivamente). Los reactivos TaqMan® utilizan sondas de oligonucleótidos marcadas con fluorocromos para detectar productos de amplificación específicos a medida que se van produciendo durante la PCR. Estas sondas constan de un fluoróforo reporter unido al extremo 5' y un quencher en el extremo 3'. Mientras la sonda está intacta, la proximidad del quencher inhibe la fluorescencia que emite el fluoróforo. Si la diana está presente, la sonda anilla entre las localizaciones de los cebadores y se rompe por la actividad de la 5' nucleasa de la Taq Polimerasa, durante la extensión. Esta ruptura separa el fluoróforo reporter del quencher, aumentando la señal del fluoróforo y quita la sonda de la cadena diana permitiendo que la extensión del cebador continúe hasta el final de la cadena del molde. En cada ciclo, se separan más moléculas de fluoróforo reporter de sus respectivas sondas, dando un aumento de la intensidad de la fluorescencia proporcional a la cantidad de amplicón producido. Cuanto más alto sea el número inicial de copias de la diana de ácido nucleico, antes se observará un significativo aumento de la fluorescencia. (Figura 4).

Para cuantificar la expresión de miR-206 en el músculo EDL, se utilizó el kit “Individual TaqMan® mi RNA assays” (Life Technologies).

Para el estudio del miRNA-206, las muestras de cDNA fueron diluidas a 1:7 añadiendo para ello 90 µl de dH<sub>2</sub>O (volumen total= 105 µl). Se realizaron triplicados para cada una de las muestras. En la mezcla de reacción se utilizaron 0.25 µl de sonda TM de miRNA Assay (20x), 2.5 µl de 2X TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix, no AmpErase® UNG (Cat# 4366073) y 2.25 µl de la dilución del cDNA correspondiente. Las etapas de la reacción de la PCR que se programaron en



el equipo StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) fueron 95°C 20 segundos, 95°C 1 segundo y 60°C 20 segundos; se fijaron 40 ciclos para los pasos 2 y 3.

Para la PCR a tiempo real de los genes *Myog* y *Myod1*, se emplearon sondas *TaqMan*® (Applied Biosystems), la mayoría de ellas están diseñadas para hibridar uniones de exones, evitando así la detección de DNA genómico que pudiera quedar en la muestra de estudio a pesar del procesado de ésta con DNasa.

Todas las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 5µL con 1x *TaqMan*® *Universal PCR Master Mix* (No *AmpErase*® *UNG*, Applied Biosystems), 1x de la mezcla cebador/sonda *TaqMan*® Applied Biosystems para cada gen estudiado y 2µl del cDNA diluido 10x por cada reacción. Las reacciones se llevaron a cabo por triplicado y las eficiencias de reacción de las distintas mezclas cebador/sonda fueron próximas al 100%. Las reacciones de PCR fueron realizadas en el equipo StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Los parámetros de los ciclos termales fueron los siguientes: incubación a 95°C durante 20s y 40 ciclos de 95°C durante 1s y 60°C durante 20s. En todos los casos, la normalización de los genes se realizó con la media geométrica de dos genes endógenos.<sup>41-43</sup>

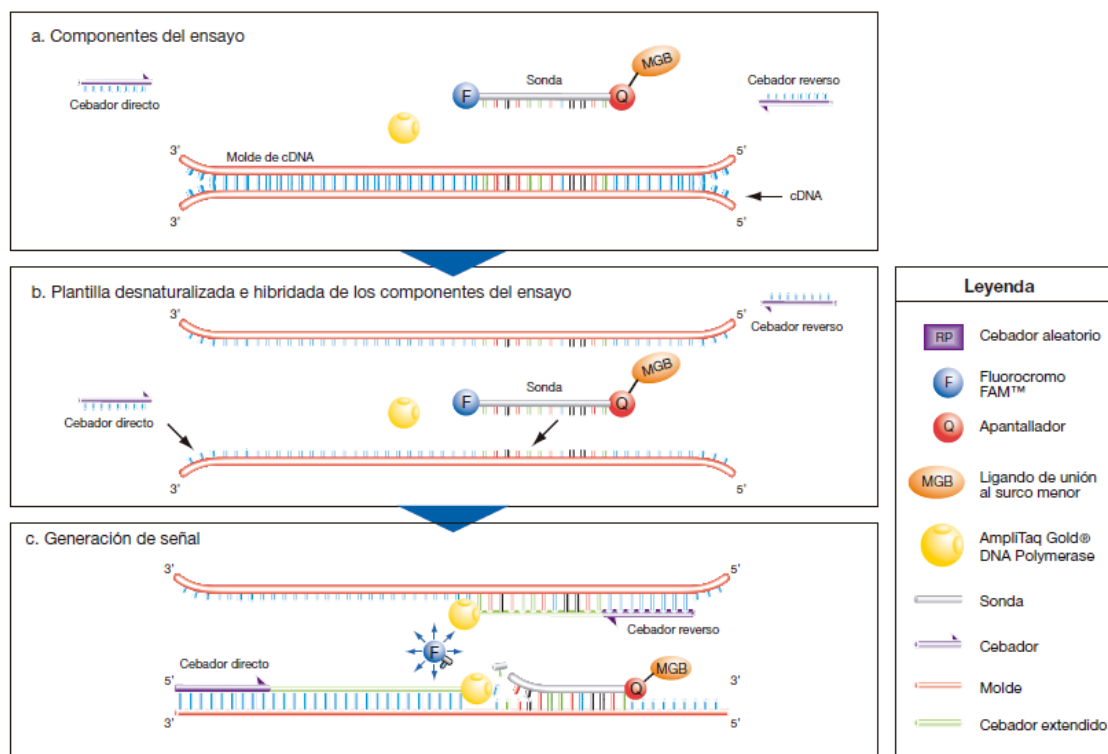


Figura 4: PCR y detección de cDNA. (Yamamoto et al., 1992)<sup>44</sup>.

## Análisis estadístico de los datos

En el primer estudio sobre la expresión génica del miRNA-206, la normalización de las muestras se realizó la media de los valores de ciclo umbral (cycle threshold, Ct) obtenidos para los normalizadores snoRNA-202 y snoRNA-234 y el resultado obtenido fue sustraído del valor Ct obtenido para miR-206, obteniéndose así los valores  $\Delta Ct$ . Seguidamente, se realizó la media de  $\Delta Ct$  para los animales control y se le restó la media de  $\Delta Ct$  de los transgénicos, obteniéndose así  $\Delta\Delta Ct$ . Para transformar el proceso exponencial en una relación lineal se utilizó la conversión  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Se utilizó el grupo control como calibrador ( $\Delta\Delta Ct = 0$ ,  $2^{-\Delta\Delta Ct} = 1$ ). Los valores de error (barras de error) también fueron determinadas utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . El análisis estadístico fue llevado a cabo mediante el test estadístico t de student, en el cual los valores obtenidos se consideran estadísticamente significativos cuando  $p < 0.05$  y muy significativos cuando  $p < 0.01$ .<sup>45</sup>

En cuanto al estudio de expresión génica de *Myog* y *Myod1* también se utilizó el test t de Student, por lo que se procedió de la misma manera que se ha explicado anteriormente, realizando en este caso la normalización de las muestras con la media geométrica de los valores de ciclo umbral (cycle threshold, Ct) obtenidos para los genes housekeeping *Gapd* y *Actb*. La significación estadística se estableció para valores significativos de  $p < 0.05$  (\*) y valores muy significativos de  $p < 0.01$  (\*\*). Para el cálculo del valor de  $\Delta\Delta Ct$  se siguió la misma metodología que en el primer estudio planteado en este trabajo.

## 5. Resultados y discusión.

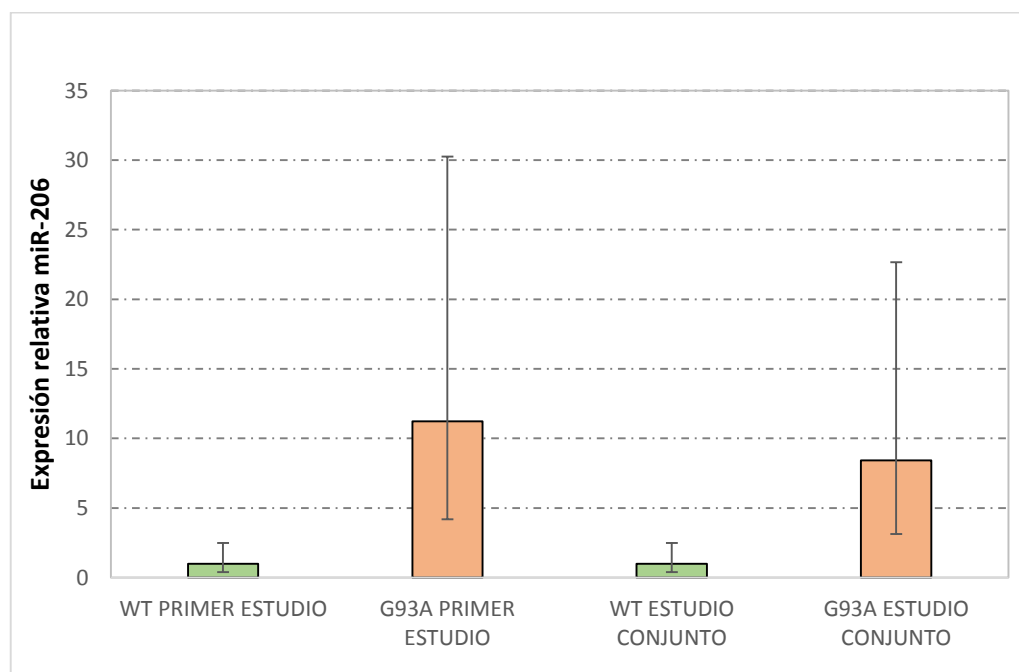
---

Para analizar los niveles de expresión de miR-206 en animales SOD1-G93A sintomáticos, se cuantificó a partir del músculo EDL izquierdo, la expresión génica de miR-206 en cuatro animales sanos (WT) y dos transgénicos (G93A), todos pertenecientes a la misma camada y con 120 días de edad, es decir, en la fase terminal de la enfermedad. Este microRNA se sobreexpresó 11.24 veces más en EDL de ratones transgénicos SOD1-G93A que en animales sanos, wild type ( $p = 0.04081$ ).

Debido a que sólo se disponía de estas dos muestras de EDL de animales transgénicos pertenecientes a la misma camada, para obtener un resultado más representativo, se consideró adecuado estudiar otras dos muestras de animales transgénicos de la misma edad pero de una

camada diferente, para comprobar si el patrón comportamental estaba ligado o no a un cambio patológico a nivel molecular que afectase a la expresión de miR-206. Junto a estas dos muestras de EDL izquierdo de animales mutantes, se estudiaron otras dos de animales control, pertenecientes a su misma camada y por tanto de la misma edad, 120 días. Los resultados que se obtuvieron fueron equivalentes a los del primer análisis, viéndose sobreexpresado miR-206 en G93A respecto a EDL control. El análisis de los datos mostró que las barras de error obtenidas, presentaban mayor grado de variabilidad que el obtenido en el primer análisis, debido a que el número de muestras procesadas fue mayor. Sin embargo, el resultado obtenido sigue siendo muy significativo ( $p=0,01323$ ), observándose un incremento bastante considerable de la expresión de miR-206, 8.42 veces más en animales transgénicos SOD1-G93A que en los animales sanos control. (Figura 5).

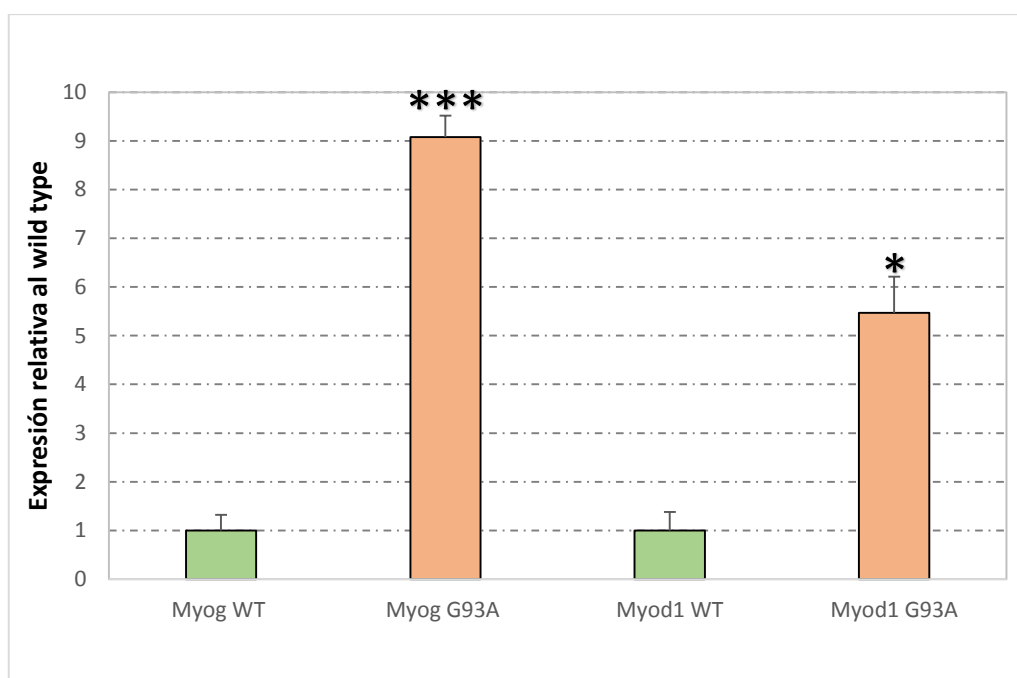
Como conclusión del primer objetivo específico planteado en este estudio, miR-206 se encuentra significativamente sobreexpresado en animales transgénicos SOD1-G93A en la fase terminal de la enfermedad respecto a los animales sanos, lo que sugiere que incluso en estadios terminales de la enfermedad existe potencial regenerativo en el músculo esquelético, en particular en EDL aún siendo vulnerable al progreso de la enfermedad.



**Figura 5. miR-206 se muestra incrementado en el músculo EDL izquierdo de animales SOD1-G93A de 120 días de edad.** Incremento significativo ( $p=0,04081$  en el primer estudio y  $p=0,01323$  en el estudio conjunto) de la expresión relativa de miR-206 en el músculo EDL izquierdo de animales SOD1-G93A en estadio terminal de la enfermedad respecto a los animales control (WT).

En el segundo objetivo específico se planteó el análisis de la expresión génica de *Myog* y *Myod1* en músculo esquelético de ratones SOD1-G93A frente a ratones sanos, wild type, de 120 días. En el análisis de PCR a tiempo real, observamos un incremento significativo de los niveles de expresión de ambos genes en ratones SOD1-G93A con respecto a animales sanos (Figura 6), resultado que concuerda con los niveles incrementados del miRNA-206, previamente descritos.

En particular, la expresión génica de *Myog* se incrementó muy significativamente 9 veces más en animales transgénicos SOD1-G93A frente a animales sanos ( $p= 0.00005$ ), mientras que la expresión de *Myod1* también fue significativamente superior en animales transgénicos frente a sanos ( $p= 0.01142$ ), lo que sugiere que incluso en el estadio terminal de 120 días, existe capacidad regenerativa en el músculo esquelético de ratones transgénicos SOD1-G93A.



**Figura 6. Niveles de expresión génica de *Myog* y *Myod1* en animales SOD1-G93A de 120 días de edad.** Los niveles de expresión de *Myog* se incrementaron 9 veces más en animales transgénicos (barra naranja) frente a animales sanos (barra verde), con una significación de  $p= 0.00005$  (\*\*\*). Análogamente, se observó un incremento también significativo en el caso de *Myod1*, incrementándose alrededor de 5 veces la expresión de este gen en animales transgénicos (naranja) frente a animales sanos (barra verde), con una significación de  $p= 0.01142$  (\*).

Estos incrementos de expresión observados tanto en *Myog* como en *Myod1* en animales transgénicos SOD1-G93A sugiere que el pool de células satélite presentes en el músculo esquelético del modelo animal permanece activo, favoreciendo la regeneración y diferenciación

celular en este tejido, aunque no sea suficiente para frenar el progreso degenerativo en el músculo. Dada la escasez de tejido EDL para realizar este segundo objetivo específico en las mismas muestras que se utilizaron en el primer objetivo del trabajo, se utilizó otro grupo de animales distintos (n= 3 transgénicos y n= 3 sanos de la misma camada) para el análisis de la expresión de *Myog* y *Myod1*, en músculo esquelético total. A pesar de este cambio en el planteamiento metodológico inicial, los resultados que se obtienen concuerdan con estudios previos realizados por el grupo de investigación, en los que se observó una correlación significativa y negativa de *Myog* y *Myod1* con la longevidad de los animales transgénicos SOD1-G93A, es decir, a mayor expresión génica de estos marcadores a lo largo de la enfermedad menor supervivencia de los animales.<sup>46</sup>

En conclusión, estos incrementos significativos de *Myog* y *Myod1* son indicativos de un estado avanzado del progreso neurodegenerativo de la enfermedad pero también indican que todavía el músculo esquelético es capaz de activar marcadores clave en la cascada de regulación miogénica, para intentar contrarrestar el avance de la degeneración a nivel muscular, en clara sincronización con nuevos marcadores potenciales de enfermedad como miR-206.

## 6. Conclusiones

---

Las conclusiones que se han obtenido con la realización de este trabajo son las siguientes:

- 1.- Los niveles de expresión del microRNA-206 (miR-206) en el músculo EDL de animales se incrementaron significativamente en animales transgénicos SOD1-G93A frente a animales sanos, lo que sugiere que en este músculo, a pesar de su vulnerabilidad frente al progreso de la enfermedad, se favorece la regeneración y diferenciación celular mediada por miR-206.
- 2.- El incremento significativo de los niveles de expresión de *Myog* y *Myod1* en músculo esquelético de animales transgénicos SOD1-G93A frente a animales sanos, concuerda con el incremento observado en la expresión de miRNA-206, y sugiere que la cascada de regulación miogénica permanece activa aún en estadios terminales.
- 3.- El músculo esquelético, y el músculo EDL en particular, parecen preservar la capacidad regenerativa para contrarrestar el avance neurodegenerativo de la enfermedad, a pesar de

que no sea suficiente para evitar la atrofia muscular que se observa en estadios avanzados de la ELA. En futuros estudios plantearemos cómo se desarrolla el progreso de estos marcadores moleculares en las distintas etapas de la enfermedad y cómo se pueden correlacionar con la longevidad de los animales para poder plantear nuevos marcadores pronóstico de enfermedad.

## Conclusions

---

The conclusions obtained in this work are as follows:

1. The expression levels of microRNA-206 (miR-206) in EDL muscle increased significantly in transgenic SOD1-G93A animals with respect to healthy animals, suggesting that in this muscle, despite their vulnerability to disease progress, cell regeneration and myogenic differentiation capacity mediated by miRNA-206 is maintained.
2. The significant increase in expression levels of *Myod1* and *Myog* in skeletal muscle SOD1-G93A transgenic animals with respect to healthy animals is in accordance with the observed increased expression of miRNA-206, suggesting that regulation of myogenic cascade remains active even in terminal stages.
3. Skeletal muscle, and in particular EDL muscle, seem to preserve the regenerative capacity to counteract the neurodegenerative disease progression, although it is not sufficient enough to prevent muscle atrophy, which is observed in advanced stages of the disease. Future studies will elucidate the variation of the expression profile of these molecular markers at different stages of the disease and how they can be correlated with longevity of the animals to discover new prognostic markers of disease.

## 7. Valoración personal.

---

El campo de la investigación siempre me ha resultado de especial interés y por eso decidí realizar un trabajo de estas características. Asimismo encuentro a la genética como una ciencia apasionante por el hecho de que es capaz de dar explicación tanto a la génesis de la vida como a muchos de los acontecimientos que suceden en los organismos a lo largo de su existencia; claro ejemplo de ello es la Esclerosis Lateral Amiotrófica, enfermedad que hasta hace meses era prácticamente desconocida para mí y que hoy encuentro un problema de gran importancia a nivel social, donde aún quedan muchos interrogantes por esclarecer para poder frenarla y combatirla con éxito.

He de destacar que debido a la escasez de muestras disponibles no ha sido posible llevar a cabo el objetivo planteado en un primer momento, que era el de comparar el nivel de expresión de estos marcadores de lesión en la fase terminal de la enfermedad, 120 días de edad, con el que se produce en la fase inmediatamente anterior del transcurso de la misma, fase sintomática, 90 días de edad, que según versa en la bibliografía conforme va progresando la enfermedad, va incrementándose el nivel de expresión de todos ellos.<sup>29, 42</sup>

Para finalizar me gustaría hacer especial hincapié en que un mayor número de muestras nos hubieran permitido llevar a cabo un estudio más preciso en el músculo EDL con respecto a los niveles de expresión de miR-206, *Myog* y *Myod1*. Sin embargo, estos resultados pueden ser el punto de partida para la identificación de nuevos marcadores de progresión de enfermedad.

## 8. Bibliografía.

---

1. Wijesekera, L.C., Leigh, P.N., 2009. Amyotrophic lateral sclerosis. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 4, 3. doi:10.1186/1750-1172-4-3
2. Jesús S. Mora Pardina (Ed.), 1999. ELA. Una Enfermedad Tratable. Prous Science, Madrid.
3. Pascual Gómez, J., 2012. Tratado de neurología. Luzán 5, Madrid.
4. Rowland, L.P., Shneider, N.A., 2001. Amyotrophic lateral sclerosis. *New England Journal of Medicine* 344, 1688–1700.
5. FUNDELA - Fundación Española para el Fomento de la Investigación de la Esclerosis Lateral Amiotrófica, (consulta 6.10.15). Disponible en: <http://www.fundela.info/>
6. Gonzalez de Aguilar, J.-L., Niederhauser-Wiederkehr, C., Halter, B., De Tapia, M., Di Scala, F., Demougin, P., Dupuis, L., Primig, M., Meininger, V., Loeffler, J.-P., 2007. Gene profiling of skeletal muscle in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Physiological Genomics* 32, 207–218. doi:10.1152/physiolgenomics.00017.2007
7. Musarò, A., 2010. State of the art and the dark side of amyotrophic lateral sclerosis. *World Journal of Biological Chemistry* 1, 62. doi:10.4331/wjbc.v1.i5.62
8. Andersen, P.M., 2006. Amyotrophic lateral sclerosis associated with mutations in the CuZn superoxide dismutase gene. *Current neurology and neuroscience reports* 6, 37–46.
9. Shaw, P.J., 2005. Molecular and cellular pathways of neurodegeneration in motor neurone disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 76, 1046–1057. doi:10.1136/jnnp.2004.048652
10. Cozzolino, M., Ferri, A., Carri, M.T., 2008. Amyotrophic lateral sclerosis: from current developments in the laboratory to clinical implications. *Antioxid. Redox Signal.* 10, 405–443. doi:10.1089/ars.2007.1760
11. Jones, A.R., Woollacott, I., Shatunov, A., Cooper-Knock, J., Buchman, V., Sproviero, W., Smith, B., Scott, K.M., Balendra, R., Abel, O., McGuffin, P., Ellis, C.M., Shaw, P.J., Morrison, K.E., Farmer, A., Lewis, C.M., Leigh, P.N., Shaw, C.E., Powell, J.F., Al-Chalabi, A., 2013. Residual association at C9orf72 suggests an alternative amyotrophic lateral sclerosis-causing hexanucleotide repeat. *Neurobiology of Aging* 34, 2234.e1–2234.e7. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2013.03.003
12. Chio, A., Battistini, S., Calvo, A., Caponnetto, C., Conforti, F.L., Corbo, M., Giannini, F., Mandrioli, J., Mora, G., Sabatelli, M., the ITALSGEN Consortium, Monsurro, M.R., Tedeschi, G., Conte, A., Luigetti, M., Lattante, S., Marangi, G., Volanti, P., Marinou, K., Papetti, L.,



- Lunetta, C., Pintor, G.L., Salvi, F., Bartolomei, I., Quattrone, A., Gambardella, A., Logroscino, G., Simone, I., Pisano, F., Spataro, R., La Bella, V., Colletti, T., Mancardi, G., Origone, P., Sola, P., Borghero, G., Marrosu, F., Marrosu, M.G., Murru, M.R., Floris, G., Cannas, A., Piras, V., Costantino, E., Pani, C., Sotgiu, M.A., Pugliatti, M., Parish, L.D., Cossu, P., Ticca, A., Rodolico, C., Portaro, S., Ricci, C., Moglia, C., Ossola, I., Brunetti, M., Barberis, M., Canosa, A., Cammarosano, S., Bertuzzo, D., Fuda, G., Ilardi, A., Manera, U., Pastore, I., Sproviero, W., Logullo, F., Tanel, R., Ajmone, C., Mastro, E., Pain, D., Mandich, P., Penco, S., Restagno, G., Zollino, M., Surbone, A., 2014. Genetic counselling in ALS: facts, uncertainties and clinical suggestions. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 85, 478–485.  
doi:10.1136/jnnp-2013-305546
13. Kong, J., Xu, Z., 1998. Massive Mitochondrial Degeneration in Motor Neurons Triggers the Onset of Amyotrophic Lateral Sclerosis in Mice Expressing a Mutant SOD1. *J. Neurosci.* 18, 3241–3250.
  14. Krasnianski, A., 2005. Mitochondrial changes in skeletal muscle in amyotrophic lateral sclerosis and other neurogenic atrophies. *Brain* 128, 1870–1876. doi:10.1093/brain/awh540
  15. Wiedemann, F.R., Manfredi, G., Mawrin, C., Beal, M.F., Schon, E.A., 2002. Mitochondrial DNA and respiratory chain function in spinal cords of ALS patients. *Journal of Neurochemistry* 80, 616–625. doi:10.1046/j.0022-3042.2001.00731.x
  16. Williamson, T.L., Cleveland, D.W., 1999. Slowing of axonal transport is a very early event in the toxicity of ALS-linked SOD1 mutants to motor neurons. *Nature neuroscience* 2, 50–56.
  17. Borchelt, D.R., Wong, P.C., Becher, M.W., Pardo, C.A., Lee, M.K., Xu, Z.-S., Thinakaran, G., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Sisodia, S.S., others, 1998. Axonal transport of mutant superoxide dismutase 1 and focal axonal abnormalities in the proximal axons of transgenic mice. *Neurobiology of disease* 5, 27–35.
  18. Murakami, T., Nagano, I., Hayashi, T., Manabe, Y., Shoji, M., Setoguchi, Y., Abe, K., 2001. Impaired retrograde axonal transport of adenovirus-mediated E. coli LacZ gene in the mice carrying mutant SOD1 gene. *Neuroscience letters* 308, 149–152.
  19. De Vos, K.J., Grierson, A.J., Ackerley, S., Miller, C.C.J., 2008. Role of Axonal Transport in Neurodegenerative Diseases\*. *Annual Review of Neuroscience* 31, 151–173.  
doi:10.1146/annurev.neuro.31.061307.090711
  20. Evaluación neurofisiológica de la afectación de motoneurona superior y del tratamiento rehabilitador en la evolución de la esclerosis lateral amiotrófica - Artículo de Fisioterapia, (consulta 4.10.15). Disponible en: <http://www.efisioterapia.net/articulos/evaluacion-neurofisiologica-afectacion-motoneurona-superior-y-tratamiento-rehabilitador>

21. Dobrowolny, G., Aucello, M., Rizzuto, E., Beccafico, S., Mammucari, C., Boncompagni, S., Belia, S., Wannenens, F., Nicoletti, C., Del Prete, Z., Rosenthal, N., Molinaro, M., Protasi, F., Fanò, G., Sandri, M., Musarò, A., 2008. Skeletal Muscle Is a Primary Target of SOD1G93A-Mediated Toxicity. *Cell Metabolism* 8, 425–436. doi:10.1016/j.cmet.2008.09.002
22. Miller, T.M., Kim, S.H., Yamanaka, K., Hester, M., Umapathi, P., Arnson, H., Rizo, L., Mendell, J.R., Gage, F.H., Cleveland, D.W., others, 2006. Gene transfer demonstrates that muscle is not a primary target for non-cell-autonomous toxicity in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 19546–19551.
23. Gurney, M.E., Pu, H., Chiu, A.Y., Dal Canto, M.C., Polchow, C.Y., Alexander, D.D., Caliendo, J., Hentati, A., Kwon, Y.W., Deng, H.X., 1994. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 264, 1772–1775.
24. Miana-Mena, F.J., Munoz, M.J., Yague, G., Mendez, M., Moreno, M., Ciriza, J., Zaragoza, P. y Osta, R., 2005. Optimal methods to characterize the G93A mouse model of ALS. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 6, 55–62.
25. Kanning, K.C., Kaplan, A., Henderson, C.E., 2010. Motor Neuron Diversity in Development and Disease. *Annual Review of Neuroscience* 33, 409–440. doi:10.1146/annurev.neuro.051508.135722
26. Kalmar, B., Novoselov, S., Gray, A., Cheetham, M.E., Margulis, B., Greensmith, L., 2008. Late stage treatment with arimoclomol delays disease progression and prevents protein aggregation in the SOD1G93A mouse model of ALS: Arimoclomol is effective in late stage SODG93A mice. *Journal of Neurochemistry* 107, 339–350. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05595.x
27. Marinkovic, P., Reuter, M.S., Brill, M.S., Godinho, L., Kerschensteiner, M., Misgeld, T., 2012. Axonal transport deficits and degeneration can evolve independently in mouse models of amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 4296–4301. doi:10.1073/pnas.1200658109
28. Mourelatos, Z., Gonatas, N.K., Stieber, A., Gurney, M.E., Dal Canto, M.C., 1996. The Golgi apparatus of spinal cord motor neurons in transgenic mice expressing mutant Cu, Zn superoxide dismutase becomes fragmented in early, preclinical stages of the disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 5472–5477.
29. Toivonen, J.M., Manzano, R., Oliván, S., Zaragoza, P., García-Redondo, A., Osta, R., 2014. MicroRNA-206: a potential circulating biomarker candidate for amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS ONE* 9, e89065. doi:10.1371/journal.pone.0089065
30. Lugo-Trampe, Á., del Carmen Trujillo-Murillo, K., 2009. MicroRNAs: reguladores clave de la expresión génica. *Medicina Universitaria* 11, 187–192.

31. Brase, J.C., Wuttig, D., Kuner, R., Sultmann, H., 2010. Serum microRNAs as non-invasive biomarkers for cancer. *Mol Cancer* 9, 306.
32. Gupta, S.K., Bang, C., Thum, T., 2010. Circulating MicroRNAs as Biomarkers and Potential Paracrine Mediators of Cardiovascular Disease. *Circulation: Cardiovascular Genetics* 3, 484–488. doi:10.1161/CIRCGENETICS.110.958363
33. Jin, X.-F., Wu, N., Wang, L., Li, J., 2013. Circulating MicroRNAs: A Novel Class of Potential Biomarkers for Diagnosing and Prognosing Central Nervous System Diseases. *Cellular and Molecular Neurobiology* 33, 601–613. doi:10.1007/s10571-013-9940-9
34. Mitchell, P.S., Parkin, R.K., Kroh, E.M., Fritz, B.R., Wyman, S.K., Pogosova-Agadjanyan, E.L., Peterson, A., Noteboom, J., O'Briant, K.C., Allen, A., Lin, D.W., Urban, N., Drescher, C.W., Knudsen, B.S., Stirewalt, D.L., Gentleman, R., Vessella, R.L., Nelson, P.S., Martin, D.B., Tewari, M., 2008. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 10513–10518. doi:10.1073/pnas.0804549105
35. Roberts, T.C., Godfrey, C., McClorey, G., Vader, P., Briggs, D., Gardiner, C., Aoki, Y., Sargent, I., Morgan, J.E., Wood, M.J.A., 2013. Extracellular microRNAs are dynamic non-vesicular biomarkers of muscle turnover. *Nucleic Acids Research* 41, 9500–9513. doi:10.1093/nar/gkt724
36. Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J.J., Lötvall, J.O., 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* 9, 654–659. doi:10.1038/ncb1596
37. Williams, A.H., Valdez, G., Moresi, V., Qi, X., McAnally, J., Elliott, J.L., Bassel-Duby, R., Sanes, J.R., Olson, E.N., 2009. MicroRNA-206 Delays ALS Progression and Promotes Regeneration of Neuromuscular Synapses in Mice. *Science* 326, 1549–1554. doi:10.1126/science.1181046
38. Charge, S.B.P., 2004. Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. *Physiological Reviews* 84, 209–238. doi:10.1152/physrev.00019.2003
39. Rosenberg, M.I., Georges, S.A., Asawachaicharn, A., Analau, E., Tapscott, S.J., 2006. MyoD inhibits Fstl1 and Utrn expression by inducing transcription of miR-206. *J Cell Biol* 175, 77–85. doi:10.1083/jcb.200603039
40. The Jackson Laboratory-a leading genetics research, (consulta 6.10.15). Disponible en: <http://www.jax.org/>
41. Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology* 3, research0034.

42. Calvo AC, Moreno-Igoa M, Manzano R, Ordovás L, Yagüe G,. 2008. Determination of the protein and RNA expression levels of the commonly used housekeeping genes in a neurodegeneration mouse model. *Proteomics* 8, 4338 – 4343.  
doi:10.1002/pmic.200890072
43. Ferguson RE, Carroll HP, Harris A, Maher ER, Selby PJ,. 2005. Housekeeping proteins: a preliminary study illustrating some limitations as useful references in protein expression studies. *Proteomics* 5, 566-571.
44. Yamamoto, Y., Chounan, Y., Nishii, S., Ibuka, T., Kitahara, H., 1992. Diastereoselectivity of the conjugate addition of organocopper reagents to. gamma.-alkoxy. alpha.,. beta.-unsaturated carbonyl derivatives. Importance of the reagent type and the double-bond geometry. *Journal of the American Chemical Society* 114, 7652–7660.
45. Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* 25, 402–408.  
doi:10.1006/meth.2001.1262
46. Calvo, A.C., Manzano, R., Atencia-Cebreiro, G., Oliván, S., Muñoz, M.J., Zaragoza, P., Cordero-Vázquez, P., Esteban-Pérez, J., García-Redondo, A., Osta, R., 2012. Genetic Biomarkers for ALS Disease in Transgenic SOD1G93A Mice. *PLoS ONE* 7, e32632.  
doi:10.1371/journal.pone.003263