



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado

**EFFECTO DE UN TRATAMIENTO EXPERIMENTAL EN PROCESOS
CELULARES ALTERADOS EN MODELOS ANIMALES DE ELA**

Autor/es

SERGIO ORTIZ ESPINOSA

Director/es

DRA. ROSARIO OSTA PINZOLAS

DRA. AMAYA RANDO ZALDUENDO

Facultad de Veterinaria

2015

ÍNDICE

1. RESUMEN	2
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1 - ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA.....	3
2.1.1 - DEFINICIÓN	3
2.1.2 - CLASIFICACIÓN	3
2.1.3 - PATOGENIA DE LA ELA	4
Exocitotoxicidad mediada por glutamato	4
Disfunción mitocondrial.....	5
Estrés oxidativo	5
Agregación proteica	6
Autofagia.....	6
Apoptosis	7
Inflamación	9
2.1.4 - ELA Y MÚSCULO ESQUÉLETICO	10
2.1.5 - TRATAMIENTO DE LA ELA	11
2.2 - 5-FLUOROURACILO.....	12
2.2.1 - DEFINICIÓN Y MECANISMO DE ACCIÓN	12
2.2.2 - 5-FLUOROURACILO EN MÚSCULO	13
2.2.3 - 5-FLUOROURACILO Y SU POTENCIAL USO EN LA ELA	13
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	15
4. METODOLOGÍA	16
4.1 - EL MODELO ANIMAL SOD1G93A.....	16
4.2 - GENOTIPADO	16
4.3 - ADMINISTRACIÓN DE 5-FLUOROURACILO	17
4.4 - ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.....	17
4.4.1 - EXTRACCIÓN DE RNA	17
4.4.2 - SÍNTESIS DE DNA COMPLEMENTARIO O RETROTRANSCRIPCIÓN.....	17
4.4.3 - PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL.....	18
4.6 - ANÁLISIS DE LOS DATOS Y ESTADÍSTICA	20
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
5.1 EXPRESIÓN DE GENES DE AUTOFAGIA EN MÚSCULO	21
5.2 EXPRESIÓN DE GENES DE APOPTOSIS EN MÚSCULO	22
5.3 EXPRESIÓN DE GENES DE INFLAMACIÓN EN MÚSCULO	23
6. CONCLUSIONES.....	26
7. VALORACIÓN PERSONAL	27
8. BIBLIOGRAFÍA	28
ANEXOS.....	31

1. RESUMEN

La Esclerosis Lateral Amiotrófica es una enfermedad neurodegenerativa devastadora y sin tratamiento. Por ello, es de vital importancia el desarrollo de terapias que permitan, por lo menos, mejorar la calidad de vida de los pacientes. Resultados previos de nuestro laboratorio han demostrado el efecto beneficioso del tratamiento con el quimioterápico 5-Fluorouracilo (5-FU) en el modelo murino de ELA SOD1G93A. En este contexto, el objetivo de este Trabajo de Fin de Grado fue determinar si el efecto del tratamiento con dicho fármaco modificaba la expresión de genes implicados en alguno de los procesos patológicos de la enfermedad: autofagia, apoptosis e inflamación.

Los resultados obtenidos indican que el tratamiento con 5-FU no modula los procesos de autofagia ni apoptosis en el músculo esquelético de los animales modelos; y sugieren que la vía inflamatoria CCL2/CCR2 podría estar implicada en el mecanismo de acción del tratamiento con 5-FU.

SUMMARY

Amyotrophic Lateral Sclerosis is a devastating neurodegenerative disease without treatment. Therefore, it's very important to develop therapies that allow, at least, improve the quality of life of patients. Previous studies in our laboratory has demonstrated the therapeutic effect of the treatment with the chemotherapeutic agent 5-Fluorouracil (5-FU) in the ALS murine model SOD1G93A. In this context, the objective of this Final Degree Work was to determine if the treatment with this drug modified the expression of genes involved in some of the pathological processes of the disease: autophagy, apoptosis and inflammation.

The results indicate that 5-FU treatment does not modulate the processes of autophagy or apoptosis in skeletal muscle of this murine model; and suggest that CCL2 / CCR2 inflammatory pathway may be involved in the mechanism of action of the treatment with 5-FU.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 - ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA

2.1.1 - DEFINICIÓN

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) es la enfermedad de motoneurona más frecuente en personas adultas. Se caracteriza por una degeneración progresiva de las motoneuronas superiores (MNS) de la corteza motora, e inferiores (MNI) del tronco del encéfalo y de la médula espinal; lo que desencadena debilidad, fasciculaciones, espasticidad, parálisis y atrofia muscular; y generalmente este fallo en el sistema neuromuscular culmina con la muerte por fallo respiratorio, de 2 a 5 años tras la aparición de los síntomas [1].

La incidencia de esta enfermedad es de aproximadamente 2 o 3 nuevos casos al año por cada 100.000 personas, y la prevalencia es de unos 4 pacientes por cada 100.000 habitantes. La edad media de aparición de los síntomas es de 55 a 60 años y el riesgo de padecerla es ligeramente mayor en los hombres que en las mujeres [2]. Además se ha propuesto que diversos factores medioambientales (pesticidas, ejercicio intenso, metales pesados, tabaco, accidentes cerebrales traumáticos, etc.) puedan ser factores de riesgo; pero por el momento la edad es el factor de riesgo más aceptado [3].

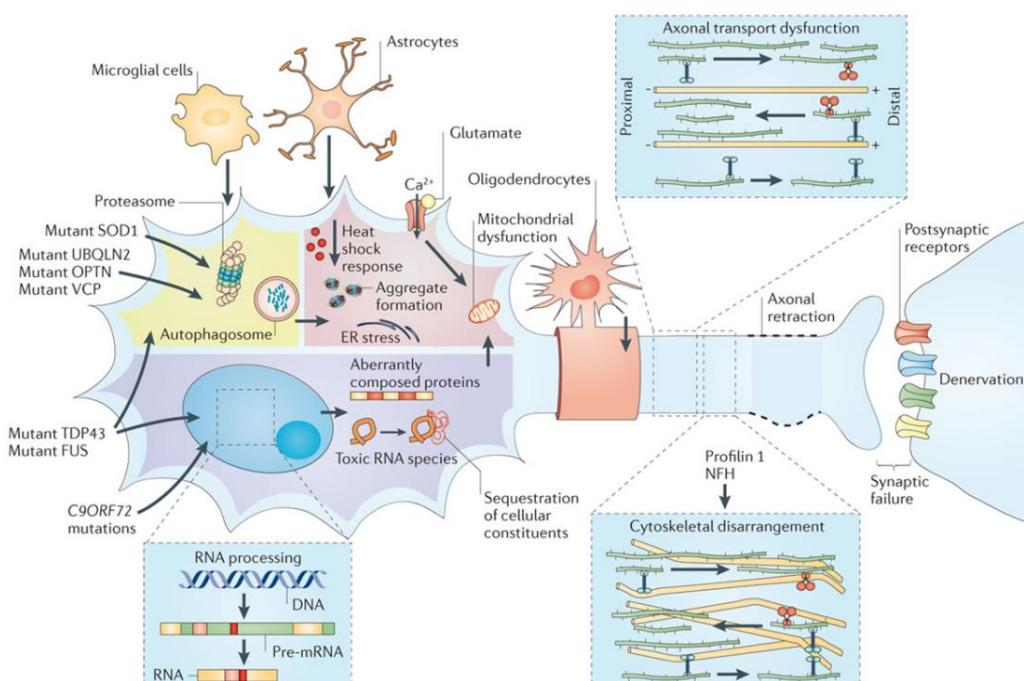
2.1.2 - CLASIFICACIÓN

En función del origen, la ELA se clasifica en 2 categorías:

- **ELA familiar:** supone tan solo un 5-10% de los casos de ELA. El origen de la enfermedad es genético, generalmente ligado una herencia autosómica dominante; y de forma más excepcional, con una herencia autosómica recesiva, maternal (genes mitocondriales) o ligado al cromosoma X. Las primeras mutaciones asociadas a la enfermedad fueron detectadas en el gen de la superóxido dismutasa 1 (Cu/Zn SOD1) que codifica para la enzima SOD1 de carácter antioxidante [4]. A pesar de que se han encontrado nuevas mutaciones, fue el descubrimiento de estas mutaciones asociadas a la SOD1 las que han permitido generar modelos animales que se han utilizado tanto en el estudio de la enfermedad como en la búsqueda de tratamiento, siendo el modelo con la mutación G93A el más utilizado. Dicho modelo ha sido utilizado en la realización de este trabajo.
- **ELA esporádico:** representa la mayor parte de los casos (90-95%) en los que no se conoce una historia familiar de ELA previa, es decir, no asociada a mutaciones [4].

2.1.3 - PATOGENIA DE LA ELA

Son varios los mecanismos moleculares afectados por la acumulación de agregados proteicos patológicos o por las mutaciones en genes afectados; y en muchas ocasiones éstos se encuentran interrelacionados (Figura 1). Entre los mecanismos moleculares afectados encontramos la **exocitotoxicidad mediada por glutamato**, la **disfunción mitocondrial**, el **estrés oxidativo**, la **agregación proteica**, la **autofagia**, la **apoptosis** y la **inflamación**, de los que hablaremos con más detalle a continuación. Además está descrita una **alteración del transporte axonal**, transporte que resulta fundamental para movilizar los componentes esenciales de la neurona, y que está mediado por neurofilamentos, que en la ELA se encuentran alterados provocando la retracción del axón, que a su vez provoca la denervación de la motoneurona en el músculo conduciendo a la muerte celular [2, 5]. También se encuentra la **alteración del tráfico endosomal**, asociada en la ELAf a mutaciones en el gen de la *Alsina*, proteína implicada en la fusión y el tráfico endosomal, además de otras mutaciones relacionadas con variantes raras de la ELA [3].



Nature Reviews | Neuroscience

Figura 1. Mecanismos patogénicos en la neurona motora implicados en la ELA [5].

Exocitotoxicidad mediada por glutamato

El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio en el Sistema Nervioso Central y mediante la unión a sus receptores post-sinápticos NMDA y AMPA incrementa la entrada del ion calcio (Ca^{2+}) al interior celular. La señal excitatoria está limitada por la recaptación de glutamato por parte de los EAATs (transportadores de aminoácidos excitatorios), que mantienen una concentración fisiológica.

La exocitotoxicidad inducida por glutamato provoca un daño neuronal como resultado de una excesiva activación de los receptores de glutamato, que puede estar causada por un aumento de los niveles de glutamato a nivel sináptico, o por un aumento de la sensibilidad de la neurona al glutamato [6]. Algunas investigaciones han observado que esta exocitotoxicidad provoca alteraciones electrofisiológicas, alteraciones de la expresión de la subunidad receptora de AMPA, y reducción en la expresión y en la actividad del receptor EAAT2, lo que provoca la muerte neuronal [9]. Sin embargo, y aunque la exocitotoxicidad inducida por glutamato es un evento patológico característico en la ELA, continúa sin resolverse la cuestión de si es un defecto primario de la degeneración de la motoneurona, o si es resultado de la enfermedad [10].

Disfunción mitocondrial

La mitocondria juega un papel importantísimo para la supervivencia celular regulando la apoptosis, como orgánulo generador de energía intracelular y en la homeostasis del calcio. Se han observado mitocondrias dañadas en tejidos afectados por ELA (médula y músculo sobre todo), especialmente en casos de ELAf causados por mutaciones de SOD1 [2].

En el ratón mSOD1, se ha demostrado una disfunción mitocondrial, al impedirse la importación de proteínas mitocondriales a causa de agregados proteicos depositados en vacuolas en el interior del espacio intermembranoso de la mitocondria, provocando alteraciones en estado redox y secuestro del factor antiapoptótico Bcl2 [7]. Además, se ven afectados tanto el intercambio de calcio entre la mitocondria y el retículo endoplasmático, como el taponamiento de calcio; lo que aumenta la susceptibilidad de las células a la alteración de la homeostasis del calcio producida por la exocitotoxicidad mediada por glutamato. Todo ello desencadena la despolarización de la membrana mitocondrial, el aumento de la peroxidación de lípidos de membrana y la reducción en la producción de ATP, lo que origina un déficit energético [2].

Además se produce una alteración en el transporte axonal mitocondrial, una disfunción mitocondrial junto a una disminución de mitocondrias en el axón distal, lo que provoca la axonopatía por “dying-back” como consecuencia del agotamiento energético [8].

Estrés oxidativo

Las especies reactivas de oxígeno (ROS), entre las que se incluyen el Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2), los aniones superóxido (O_2^-), el ácido hipocloroso y los radicales hidróxido ($-OH$) se forman como consecuencia del normal metabolismo de la célula eucariota. El estrés oxidativo se produce cuando hay un desequilibrio entre la generación de ROS y su eliminación, junto con la capacidad de la maquinaria celular de eliminar o reparar el daño inducido por las mismas.

Dicho estrés provoca daños estructurales y cambios en las vías de señalización redox; además de incrementar otros procesos fisiopatológicos, contribuyendo al daño en la neurona motora, provocando la muerte neuronal y, por consiguiente, el comienzo de la neurodegeneración [9].

Las mutaciones de SOD1 que afectan a su actividad, puede ser la principal causa del daño oxidativo y, por tanto, activar la apoptosis o causar alteraciones en la mitocondria como la disminución en la actividad de los complejos respiratorios, la despolarización de la membrana y la liberación de citocromo C [9]. Además, se han encontrado evidencias de daño oxidativo en RNA del sistema nervioso central tanto en pacientes como ratones mSOD1. También se ha demostrado que se mantiene activa la enzima Rac1, con el consiguiente aumento en la producción de ROS [10].

Agregación proteica

Uno de los rasgos característicos de la ELA, así como de otras enfermedades neurodegenerativas (Parkinson, Alzheimer, Huntington), es la formación de agregados proteicos, consistentes en proteínas mal plegadas con conformación en lámina β [11].

La proteína mSOD1 mal plegada se une a ubiquitinas para ser eliminada a través del proteasoma; sin embargo esto no sucede y se acumula en dímeros y más tarde en agregados proteicos, pudiendo tener un efecto directo tóxico sobre la respiración mitocondrial o el transporte axonal, o indirecto sobre la proteostasis celular, provocando alteraciones en el correcto desarrollo de estos mecanismos [12]. También se ha identificado a la proteína TDP-43 como el principal constituyente de los agregados proteicos tanto en la ELAf como en la ELAe [13].

Autofagia

La autofagia es un proceso citoprotector que consiste en la degradación de componentes intracelulares a través de lisosomas. Los lisosomas son el principal componente de este sistema proteolítico y contienen en su lumen una gran variedad de hidrolasas celulares, entre las que se encuentran las lipasas, las glicolasas, las proteinasas, y las nucleotidasas; que son las responsables de degradar los productos de deshecho [14]. El objetivo de la autofagia es el de proteger la célula de situaciones de estrés (como el que suponen los agregados proteicos tóxicos) mediante el secuestro del contenido citoplasmático causante de dicho estrés en los autofagosomas y su posterior transporte a los lisosomas, donde se lleva a cabo su degradación [15].

Mediante la autofagia no sólo se produce la simple eliminación de materiales, sino que además sirve como un sistema dinámico de reciclaje en el que se producen nuevos sustratos y energía para la renovación celular y la homeostasis celular [16]. No obstante, cuando se produce la pérdida del control del proceso autófágico y éste se encuentra excesivamente inducido, se puede producir la muerte celular. Este proceso se conoce como muerte programada de tipo II [17].

En el caso de la ELA y otras enfermedades neurodegenerativas, en un intento de eliminar los agregados proteicos, la autofagia está incrementada. La degeneración y muerte de las motoneuronas se produce ya en la fase final de la enfermedad a causa de la disminución de la autofagia, ya sea por fallo o por bloqueo de la misma, produciéndose una agregación de proteínas mutadas (siendo SOD1 y TDP43 las principales) estando dicha agregación implicada en la muerte neuronal. Por otro lado, la disminución de la autofagia puede promover una disfunción mitocondrial y un aumento de la susceptibilidad a la muerte celular [18].

La mayor parte de los estudios sobre el proceso de la autofagia en el modelo murino SOD1G93A están relacionados con las motoneuronas, e indican que tanto la presencia de abundantes vacuolas autofágicas como el aumento de proteínas relacionadas con el proceso de la autofagia son debidos a un defecto en la progresión de la misma [12, 19] y a la falta de un mecanismo compensatorio. Estas alteraciones se demostraron en un estudio en el que se relacionó el comienzo de la enfermedad y los síntomas con un proceso autofágico defectuoso con acumulación de autofagosomas. Además, esta alteración de la autofagia está presente en estadios presintomáticos de la enfermedad [20].

En el caso del músculo esquelético, se ha observado que la eliminación de mSOD1 es más eficiente en células musculares que en motoneuronas posiblemente por una mayor inducción de la autofagia por mSOD1 [21]. Por otro lado, otro estudio parece indicar que, además, las células musculares son más resistentes a la acumulación de mSOD1 [22]. Sin embargo, todavía se desconoce si el efecto tóxico de mSOD1 se debe a una alteración del proceso autofágico o a la propia acumulación de mSOD1 [21].

Apoptosis

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada, que está caracterizada por una serie de cambios morfológicos, como son la condensación (*pyknosis*) y la fragmentación (*karyorrhexis*) del núcleo; así como la formación de cuerpos apoptóticos. Además, está acompañado por una serie de cambios bioquímicos característicos entre los que se incluyen la permeabilización de la membrana mitocondrial exterior (MOMP, mitochondrial outer membrane permeabilization), la activación de caspasas efectoras (caspasa 3, 6 y 7) y la activación de hidrolasas catabólicas que degradan la mayoría de las macromoléculas celulares, incluyendo el DNA [23].

En general, existen dos tipos de apoptosis (Figura 2): la intrínseca que se induce intracelularmente, estimulada por estímulos mitocondriales, y puede ser dependiente o independiente de caspasas; y la extrínseca, cuya activación extracelular, es estimulada por la unión de moléculas solubles que se

unen a receptores de membrana, y que puede estar mediada por receptores de dependencia o por receptores de muerte [24], como consecuencia de situaciones de estrés.

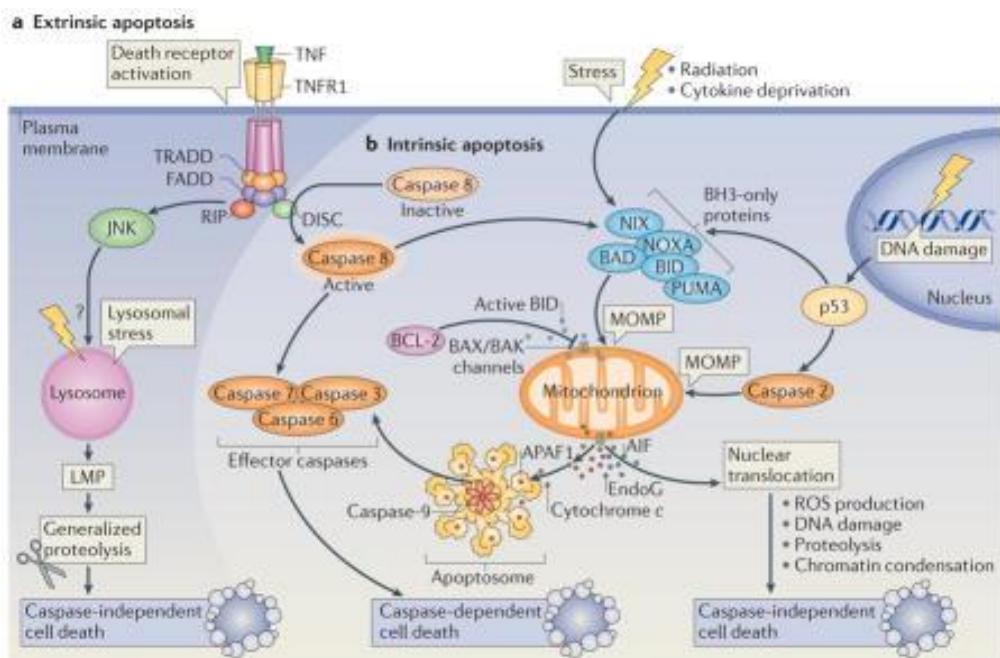


Figura 2. Apoptosis extrínseca (a) e intrínseca (b) [23].

La vía intrínseca se inicia a raíz de estímulos intracelulares, como daños en el DNA, la hipoxia, el estrés oxidativo o la privación del factor de crecimiento; induciendo la permeabilización de la membrana mitocondrial externa [25]. Dicha integridad es controlada por moléculas de la familia de Bcl-2, ya sean proapoptóticas (como Bax o Bak) o antiapoptóticas (Bcl-2, MCL-1). Tras la permeabilización se libera al citosol el citocromo c, que se une a la proteína apoptótica factor activador 1 (Apaf-1) e inicia la formación del apoptosoma, el cual se une a la caspasa 9 e inicia la cascada de caspasas efectoras. En la apoptosis independiente de caspasas se liberan proteínas AIF o EndoG que translocan el núcleo y promueven la fragmentación del DNA [24].

Se ha propuesto que la apoptosis pueda estar implicada en la muerte celular que aparece en la Esclerosis Lateral Amiotrófica. En estudios en el modelo murino SOD1G93A se han encontrado mitocondrias con crestas dilatadas y desorganizadas en dendritas y axones de motoneuronas en el comienzo de la enfermedad [26]. Además la presencia de agregados proteicos de mSOD1 en la membrana externa mitocondrial sugiere que dicha proteína tenga un efecto directo sobre la función mitocondrial; siendo también capaz de unirse a Bcl-2 de forma aberrante en dicha membrana, desencadenando la toxicidad mediada por ésta proteína [27]. Dichos estudios sugieren que la alteración mitocondrial desempeñe un papel principal en la degeneración neuronal.

El bloqueo de la proteína Bax (proapoptótica), retrasa el comienzo de la enfermedad y previene la muerte de las motoneuronas en el modelo mSOD1; no obstante la degeneración mitocondrial continúa, lo que sugiere que la apoptosis mediada por mitocondrias es secundaria a la degeneración neuronal [28]; mientras que en otro estudio en el mismo modelo se bloquearon Bax y Bak (proapoptóticas) produciéndose un aumento de la supervivencia de los animales [29].

En el caso del músculo esquelético, apenas se han realizado estudios sobre la atrofia muscular en la ELA asociada a la apoptosis. Sin embargo, en varios estudios se ha sugerido un patrón retrógrado en el que la degeneración y atrofia muscular precede a la muerte de la motoneurona, siendo dicha atrofia la que altere la unión neuromuscular produciendo a su vez una degeneración axonal retrógrada y la muerte neuronal; obteniéndose resultados que indicaban que la atrofia muscular asociada a la expresión de SOD1 modifica la expresión de algunos genes relacionados con apoptosis [30].

Inflamación

Cuando se habla de inflamación en la ELA, se habla generalmente de **neuroinflamación**, que afecta al SNC y está mediada por la microglía, células inflamatorias innatas del SNC siendo la más conocida y estudiada. En los animales modelo de la enfermedad la respuesta neuroinflamatoria se encuentra activada y juega un importante papel en la patogenia de la enfermedad, sugiriendo que en la degeneración de las motoneuronas también participan células no neuronales y hallándose una correlación entre la activación de la microglía y la patogénesis de la enfermedad[31].

Además los linfocitos T son capaces de regular la respuesta de la microglía mediante la secreción de diferentes interleucinas y citoquinas. Durante las fases iniciales de la enfermedad, los linfocitos T reguladores son abundantes en la médula espinal y mantienen a la microglía en el estado M2 de respuesta antiinflamatoria. Esta interacción parece ser beneficiosa, aunque en fases posteriores de la enfermedad, los linfocitos T reguladores disminuyen, y la microglía induce la muerte neuronal mediante el incremento de la respuesta citotóxica M1 en detrimento de la clásica respuesta neuroprotectora M2 [32, 33].

Otras células que juegan un papel importante son los macrófagos, entre los cuales podemos distinguir a grandes rasgos los resultantes del reclutamiento de monocitos periféricos al SNC por parte de la microglía que promueven la muerte neuronal, y los macrófagos fagocíticos residentes que son capaces de activar los linfocitos B y T CD8+ dando lugar a una respuesta inmune citotóxica [32].

Por último cabe destacar el papel de los oligodendrocitos, ya que degeneran continuamente, reduciéndose por tanto la expresión del transportador de lactato (MCT1), que junto a una falta de soporte trófico pueden dar lugar a la degeneración neuronal [32].

Se podrían conseguir efectos beneficiosos en la progresión de la enfermedad mediante la regulación de estos mediadores, y la reducción de la neuroinflamación, revertiendo el efecto neurotóxico que se produce en la enfermedad, y recuperando sus propiedades neuroprotectoras [34].

En referencia al **músculo**, apenas hay estudios sobre la inflamación en el mismo y la ELA, que es un interesante y amplio campo en el que se podría empezar a estudiar debido a la importancia que está adquiriendo la inflamación en el desarrollo de la ELA.

2.1.4 - ELA Y MÚSCULO ESQUÉLETICO

Hasta hace poco se asumía que las alteraciones y la degeneración muscular eran consecuencia de la pérdida de motoneuronas en el SNC, lo que conllevaba una pérdida de inervación muscular. Sin embargo, actualmente se ha demostrado la participación del músculo en la ELA, en el cual aparecen alteraciones con anterioridad a la aparición de las alteraciones en el soma de las motoneuronas, degeneración y muerte de las mismas. Las mencionadas alteraciones musculares observadas son un incremento en la captación de nutrientes, modificaciones en el metabolismo de los lípidos y los carbohidratos, y alteraciones tanto en la morfología como en las funciones mitocondriales; permitiendo de esta manera explicar el estado hipermetabólico del músculo típico de músculos con un estado avanzado de ELA [35, 36]. En nuestro grupo de investigación se está desarrollando una línea de investigación para conocer el papel del músculo en la enfermedad.

También se ha observado una correlación entre la longevidad de los ratones mSOD1 con la expresión de genes en el músculo esquelético; así como alteraciones en genes relacionados con la degradación proteica, la producción de ATP y con procesos de crecimiento, diferenciación y muerte celular [37]. Además se ha demostrado que la expresión de microRNAs específicos de músculo se ve alterada por la enfermedad, por ejemplo, estando aumentado el microRNA-206 tanto en humanos como en modelos animales, desarrollando estos últimos más rápido la enfermedad y mostrando menor supervivencia [38].

Cabe destacar que varios estudios demuestran que las alteraciones a nivel mitocondrial encontradas en músculo aparecen mucho antes del comienzo de los primeros síntomas, sugiriendo que la atrofia muscular se produce con anterioridad a la alteración de la unión neuromuscular, alteración que origina degeneración axonal y muerte neuronal. Esto evidencia la gran importancia la relación entre músculo y SNC, y el mantenimiento de dicha unión [35, 39].

Una de las explicaciones podría deberse a la capacidad del músculo esquelético de secretar factores que influyen en el crecimiento axonal, en el mantenimiento de las conexiones sinápticas y en la supervivencia neuronal; ya que si dicho aporte trófico desaparece se podría provocar una degeneración de las motoneuronas, abriendose un campo terapéutico importante [40].

2.1.5 - TRATAMIENTO DE LA ELA

El riluzol es el único fármaco aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA) para el tratamiento de la ELA, el mecanismo de acción no está perfectamente definido, pero se cree que actúa sobre el receptor NMDA inhibiendo la liberación de glutamato por parte de la neurona presináptica. En cambio, otros antagonistas del glutamato como los aminoácidos de cadenas ramificadas no han mostrado efectos beneficiosos en los ensayos clínicos.

No obstante, los efectos del riluzol sobre los pacientes con ELA no son tan beneficiosos como se desearía, ya que apenas prolonga la vida del paciente de 3 a 5 meses, sin observarse efecto en todos los pacientes. Por ello, el tratamiento está orientado a paliar los síntomas y se complementa con el cuidado de neurólogos, fisioterapeutas, etc.; además de otros tratamientos paliativos complementarios y suplementos en la dieta de vitamina E, vitamina C, vitaminas B, selenio, zinc, coenzima Q10 y otros antioxidantes (Guía para la atención de la Esclerosis Lateral Amiotrófica en España).

Por todo lo expuesto, es de gran importancia el estudio y desarrollo de las nuevas terapias. Las diferentes aproximaciones terapéuticas propuestas están encaminadas a modular los diferentes mecanismos moleculares implicados en la patogenia de la enfermedad e inducir un efecto beneficioso en la progresión de la misma que se encuentran en diferentes fases de desarrollo experimental: **terapia antiglutamatérgica** (busca disminuir los niveles de glutamato), protección frente a las alteraciones metabólicas en la mitocondria (pretende corregir la disfunción mitocondrial que se produce en la ELA), **terapia antiagregados proteicos** (trata de estimular la autofagia para disminuir el número de agregados proteicos), **modulación de la respuesta inmune** (consiste en el uso de inmunosupresores o inmunomoduladores con el objetivo de reducir la neuroinflamación), **protección de la unión neuromuscular y del músculo esquelético** (esta terapia busca preservar la integridad de la placa motora ya que la unión neuromuscular es una diana terapéutica accesible) y **administración de neurotróficos** (los factores neurotróficos son vitales para la supervivencia neuronal promoviendo la supervivencia y la diferenciación neuronal) (revisado por Rando en 2015 [41]). En los Anexos se presenta una tabla (Tabla 1) en la que se recogen todos los tratamientos que se están llevando a cabo actualmente [42].

Además, actualmente se están desarrollando otras terapias más innovadoras como la **terapia génica** y la **terapia celular**. La **primera** consiste en la introducción en las células de material genético con un valor terapéutico y que puede aplicarse tanto *in vivo*, introduciendo el material genético directamente en las células del organismo; como *ex vivo*, donde las células a tratar son extraídas del paciente y sometidas al proceso de transferencia *in vitro*, para su posterior reintroducción en el paciente. En la ELA se ha buscado el silenciamiento de genes que codifican para proteínas mutadas asociadas a ELAs familiares. La **terapia celular** consiste en la aplicación de las células a la reparación de tejidos destruidos o dañados; en la ELA se ha buscado el trasplante de células madre buscando por un lado el reemplazo celular, y por otro la neuroprotección mediante el aporte de factores neurotróficos y la modulación del ambiente tóxico extracelular en el que se encuentra la neurona [41].

Finalmente, en el contexto de enfermedades huérfanas como la ELA, cobra especial importancia el reposicionamiento de fármacos, la búsqueda de nuevas aplicaciones terapéuticas a fármacos ya comercializados, fármacos que puedan actuar evitando o disminuyendo la alteración de alguno de los mecanismos moleculares afectados en la enfermedad; esta estrategia presenta ventajas comerciales y económicas, sobre todo acortando plazos para la venta del fármaco y reduciendo los costes de la comercialización. En nuestro grupo de investigación están llevando a cabo este tipo de aproximación, en particular con el anticancerígeno 5-FU.

2.2 - 5-FLUOROURACILO

El 5-Fluorouracilo (5-FU) es un análogo del uracilo ampliamente usado como agente quimioterápico en el tratamiento de varios tipos de neoplasias. La terapia basada en el 5-FU ha demostrado que aumenta significativamente tanto la tasa de respuesta, como la de supervivencia al cáncer de mama, de cabeza y de cuello; presentando también una alta efectividad en tumores digestivos de colon y recto avanzados, siendo el quimioterápico de elección en este tipo de tumores [43].

2.2.1 - DEFINICIÓN Y MECANISMO DE ACCIÓN

El 5-Fluorouracilo (5-FU) es un análogo del uracilo, pertenece a la familia de los antimetabolitos, que actúan inhibiendo procesos biosintéticos esenciales para la célula, o incorporándose en macromoléculas como DNA o RNA a los que afecta en su funcionalidad. La actividad del 5-FU radica fundamentalmente en la inhibición de la enzima timidilato sintasa (TS), esencial para la síntesis de timidilato (dTMP), que es un nucleósido requerido para la replicación del DNA; induciendo, en consecuencia, la detención del ciclo celular, bloqueando las fases G1/S del ciclo celular, llevando a

la célula a la entrada en apoptosis, sobre todo para las células con una alta tasa de replicación, como lo son las células tumorales [44, 45].

El 5-FU es administrado de forma parenteral mediante bolo o infusión intravenosa en humanos, aceptándose como equivalente la administración intraperitoneal en ratones [41]. El 5-FU entra rápidamente a la célula usando los mismos mecanismos de transporte facilitado de las bases púricas y pirimidínicas y mediante difusión no facilitada [46]. Ya en el interior celular se incorpora a diferentes rutas del metabolismo anabólico transformándose en diferentes metabolitos activos, siendo la fluorodesoxiuridina monofosfato (FdUMP) el metabolito que inhibe la TS; y los otros metabolitos, el nucleótido trifosfato de desoxifluorouridina (FdUTP) y el nucleótido trifosfato de fluorouridina (FUTP), los que se incorporan a las hebras de DNA o RNA de forma aberrante. El catabolismo del 5-FU se produce principalmente en el hígado, donde la enzima dihidroprimidina deshidrogenasa (DPD) convierte el 5-FU en dihidrofluorouracilo (DHFU) que es posteriormente secretado [47] (Figura 1 en Anexos).

2.2.2 - 5-FLUOROURACILO EN MÚSCULO

No hay estudios que describan los efectos de la administración de 5-FU en el músculo esquelético ni a nivel *in vivo* ni *in vitro*; sin embargo los efectos sobre el músculo cardiaco sí que han sido estudiados, inhibiendo la proliferación de los miocitos cardiacos, mediante la inducción de la apoptosis de los mismos, provocando una desorganización del citoesqueleto de actina que está detrás de las alteraciones en la contractibilidad descritas en la literatura [48].

2.2.3 - 5-FLUOROURACILO Y SU POTENCIAL USO EN LA ELA

Los citostáticos en dosis bajas se usan en la Esclerosis Múltiple (EM) por su efecto inmunosupresor, estando limitada su utilización por sus efectos secundarios. Sin embargo, en pacientes con EM que desarrollan un cáncer, el uso de estos fármacos mejora tanto el cáncer como la EM, pudiendo estar recomendado el uso de 5-FU u otros quimioterápicos en casos de EM de evolución clínica muy agresiva [49]. Además ya se han explicado previamente los efectos patológicos de la inflamación en la ELA, en la que se produce un infiltrado inflamatorio en el SNC formado principalmente por linfocitos T reguladores, que interaccionan con las células de la glía siendo la interacción beneficiosa en el inicio de la enfermedad y patológica según avanza ya que los linfocitos acaban produciendo un cambio en la respuesta de las células de la glía hacia un patrón neurotóxico. Por tanto, la administración de 5-FU en la ELA reduce los niveles de linfocitos circulantes y este hecho podría contrarrestar los efectos patológicos de la inflamación [41].

También hay que destacar estudios recientes que sugieren que el 5-FU puede bloquear la acumulación de mSOD1; pudiendo ser este efecto un fenotipo oculto del fármaco siendo solo biológicamente activo cuando se produce un mal plegamiento de la SOD; o un efecto independiente de la diana terapéutica [50].

Asimismo, la uridina es necesaria para el correcto funcionamiento de la mitocondria pudiendo ser beneficiosa en enfermedades en las que dicho funcionamiento está alterado como la ELA; y también tiene efecto neuroprotector e incrementa los niveles de ATP y optimiza la producción de energía por la vía glucolítica. Dichas propiedades son de interés en un candidato terapéutico para la ELA [51]. Y ahora además sabemos que la uridina es capaz de reducir los agregados proteicos *in vitro*, con lo que también podría tener un efecto beneficioso por reducción de dichos agregados.

Basándose en estos antecedentes, un reciente estudio llevado a cabo por nuestro laboratorio, ha demostrado que el tratamiento de los ratones transgénicos para la mSOD1 humana con 5-FU, retrasa el inicio de la enfermedad, mejora el rendimiento motor de los animales y aumenta la supervivencia del modelo [41], aunque de momento, el mecanismo de acción por el que el fármaco produce su efecto beneficioso no está claro, siendo necesario la realización más estudios para conocer la diana o modificación de los procesos celulares que ocasiona el fármaco.

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Ante estos antecedentes nos propusimos como objetivo general de este Trabajo de Fin de Grado conocer el efecto de la aplicación del fármaco 5-Fluorouracilo sobre procesos fisiológicos afectados en el modelo animal mSOD1 de Esclerosis Lateral Amiotrófica en el músculo esquelético.

Para la consecución de este objetivo general se propuso la consecución de los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar el efecto del fármaco sobre la expresión de genes relacionados con el proceso de autofagia a nivel del músculo esquelético en los animales mSOD1.
2. Determinar el efecto del fármaco sobre la expresión de genes relacionados con el proceso apoptótico a nivel del músculo esquelético en los animales mSOD1.
3. Determinar la expresión de genes relacionados con el proceso inflamatorio en el músculo esquelético del modelo animal y conocer la modulación de dicha expresión tras la administración del fármaco.

4. METODOLOGÍA

Para la realización del presente Trabajo Fin de Grado se ha empleado la metodología descrita a continuación.

4.1 - EL MODELO ANIMAL SOD1G93A

Para la realización de este Trabajo de Fin de Grado se ha utilizado el modelo murino de Esclerosis Lateral Amiotrófica SOD1G93A. Se trata de un ratón transgénico clásico de alta copia para el gen SOD1 humano mutado (G93A), con fondo genético de la cepa B6SJL (B6SJL-Tg (SOD1-G93A) 1Gur/J) obtenidos de la casa comercial The Jackson Laboratory. Los controles utilizados fueron hermanos de camada no transgénicos o wild-type (WT).

Los grupos experimentales se realizaron teniendo en cuenta el sexo de los animales de forma equilibrada; se utilizaron 24 animales, 12 hembras y 12 machos, repartidos en 3 grupos: los animales no transgénicos (WT), los animales transgénicos tratados con suero salino fisiológico y los animales transgénicos tratados con 5-Fluorouracilo (n=8).

Los animales fueron alojados en el Servicio de Animalario del Servicio General de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de Zaragoza cumpliendo la normativa española relativa al Bienestar Animal. Además, todos los experimentos y procedimientos seguidos fueron aprobados por la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza (Procedimiento PI31/10).

Los animales fueron alojados bajo ciclos de luz y oscuridad de 12 horas con unas condiciones ambientales de temperatura (21º-23ºC) y humedad relativa (55%) controladas. Además los animales recibieron agua y comida ad libitum. Las condiciones sanitarias fueron controladas mediante análisis bacteriológicos, parasitológicos y serológicos.

4.2 - GENOTIPADO

Previamente a la realización del experimento se procedió al genotipado de los animales para la identificación de los individuos transgénicos (que expresarán la mSOD1 humana) y de los Wild-Type. Dicha identificación se realizó mediante la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) sobre el DNA extraído mediante la técnica HotSHOT [52] procedente de la cola de los ratones. Se sometió dicha fracción de tejido de la cola a lisis con Hidróxido de Sodio 50 mM a 98ºC durante 30 minutos, tras lo cual, se neutralizó con TRIS 1M y se centrifugó 12000 rpm durante 5 minutos para separar el sobrenadante que es la fracción que contiene el DNA.

El genotipado se llevó a cabo amplificando simultáneamente el gen interleucina 2 (IL-2), como control de la amplificación, y un fragmento del gen SOD1 mutado humano; para posteriormente visualizar los productos amplificados en un gel de agarosa al 2% con tinción de bromuro de etidio.

4.3 - ADMINISTRACIÓN DE 5-FLUOROURACILO

Se inyectaron 150 mg de 5-Fluorouracilo por kilo de peso de ratón por vía intraperitoneal. El 5-Fluorouracilo (Sigma-Aldrich) se resuspendió en suero fisiológico justo antes de cada administración (15 mg/ml). El tratamiento consistió en tres inyecciones de 5-Fluorouracilo (5-FU), cada dos semanas, comenzando a los 75 días de edad (10 semanas). Como controles se utilizaron animales transgénicos que recibieron únicamente solución salina, y animales no transgénicos.

4.4 - ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

El estudio de la expresión génica se realizó sobre muestras de músculo esquelético. Los ratones fueron eutanasiados a los 105 días de edad mediante inhalación de CO₂ (Dióxido de Carbono), método aceptado para la eutanasia de pequeños roedores, e inmediatamente ambos músculos *Quadriceps femoris* fueron diseccionados, congelados en nitrógeno líquido y conservados a -80°C. Como paso previo al uso de dichos músculos en estudios de expresión génica, éstos se pulverizaron con nitrógeno líquido por medio del sistema CellcrusherTM (Cellcrusher).

A continuación se describen las técnicas de extracción de RNA, eliminación de DNA genómico y retrotranscripción de las muestras, previas al análisis de expresión de los distintos genes estudiados en este trabajo mediante la técnica de la PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR).

4.4.1 - EXTRACCIÓN DE RNA

La extracción de RNA procedente de muestras de músculo se realizó mediante el método de Trizol-Cloroformo. Se añadió al músculo pulverizado el reactivo Trizol Reagent (Invitrogen) y se homogenizó con un homogeneizador de muestras (IKA T10 UltraTurrax). Posteriormente el RNA se separó con cloroformo y se precipitó con isopropanol. A continuación, se lavó con etanol al 75% y se resuspendió el RNA en agua DEPC. Por último, se eliminó el DNA genómico mediante el kit Turbo DNA-free de Ambion (Ref. 1907) siguiendo las indicaciones de la casa comercial; con el objetivo de evitar las amplificaciones inespecíficas debidas a la presencia de dicho DNA que podrían alterar los estudios de expresión génica.

4.4.2 - SÍNTESIS DE DNA COMPLEMENTARIO O RETROTRANSCRIPCIÓN

La concentración de RNA obtenida se midió mediante el espectrofotómetro (NanoDrop ND-1000, Thermo Scientific) y la cantidad de RNA a retrotranscribir se ajustó a 2 µg de RNA por muestra, que se evaporó en el speedvac. El resto del RNA obtenido se almacenó a -80°C.

Para realizar la Retrotranscripción (RT) se empleó el kit Super-ScriptTM First-Strand Synthesis System (Ref. 12371-019), siguiendo las indicaciones del fabricante. El cDNA resultante se almacenó a -20°C para su uso posterior.

4.4.3 - PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL

Es una técnica que permite la visualización inmediata de la cantidad de DNA que se ha amplificado en cada ciclo, y conocer la cantidad relativa de cDNA presente en esa muestra; tras normalizar con unos genes de referencia o housekeeping. Por tanto es una técnica que nos permite cuantificar la expresión relativa de los genes de estudio respecto a un grupo control o normalizador, que en el presente experimento son los ratones WT. La técnica se fundamenta en el uso de fluoróforos que emiten una cantidad de fluorescencia directamente proporcional al número de copias del fragmento amplificadas. Para la realización de este Trabajo de Fin de Grado se empleó la metodología de Sondas Taqman® y el fluoróforo SYBRGreen.

Sondas Taqman

Las sondas Taqman® son sondas de oligonucleótidos que se diseñan de forma complementaria al cDNA de interés y que tienen adheridas en sus extremos un *reporter* o molécula fluorófora que emite fluorescencia; y un *quencher* que la absorbe. En un primer paso, la sonda se hibrida por complementariedad de bases al cDNA molde. Durante la síntesis del cDNA complementario y dada la actividad endonucleasa de la DNA polimerasa, la sonda se rompe, se separa el *quencher* del *reporter* y la fluorescencia emitida es registrada al final de cada ciclo por el aparato, reflejando de este modo la cantidad de DNA sintetizado (Figura 3).

En cada ciclo se separarán más *reporters* provocando un aumento de la intensidad de la fluorescencia, que es proporcional a la cantidad de amplificación producida. Cuanto más alto sea el número inicial de copias del gen estudiado, antes se observará un aumento significativo de la fluorescencia.

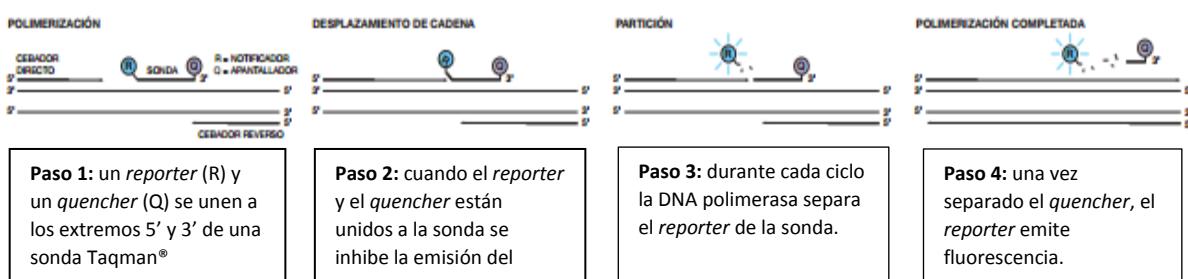


Figura 3. Funcionamiento de los reactivos Taqman (Modificado de Applied Biosystem).

SYBRGreen

La molécula de SYBRGreen es una molécula capaz de intercalarse entre las dos hebras de la doble hélice de DNA y emitir fluorescencia. Conforme la DNA polimerasa crea nuevas copias de la hebra molde, incrementa la intensidad de la fluorescencia, ya que el SYBRGreen se une a todas las cadenas de doble hélice, obteniéndose un incremento en la intensidad de la fluorescencia que es directamente proporcional a la cantidad de producto de la PCR producido (Figura 4).

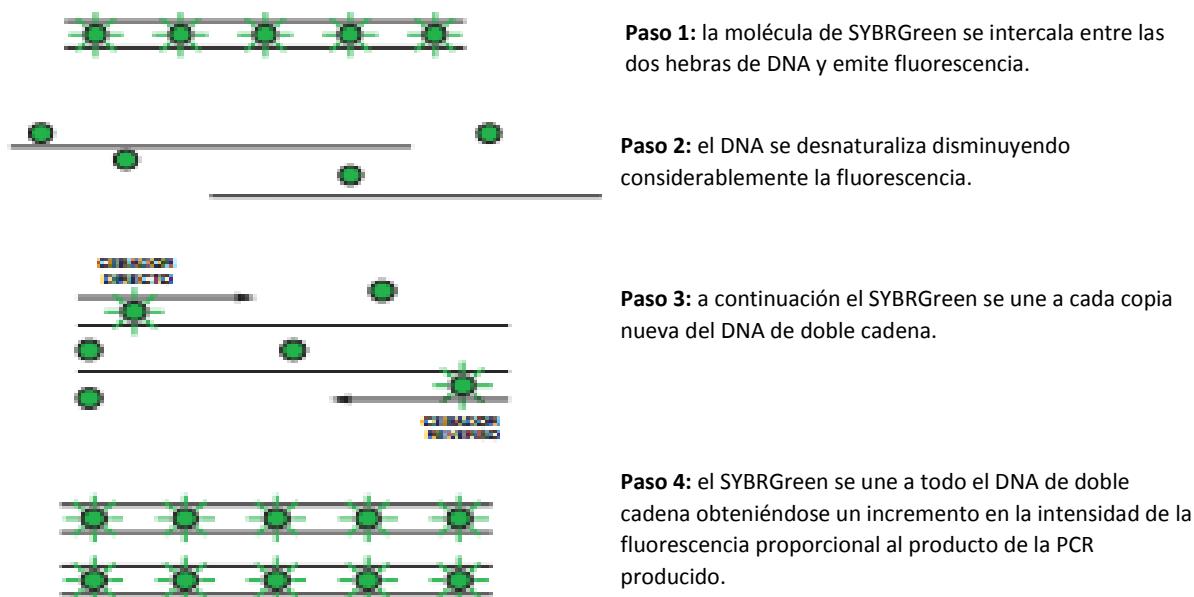


Figura 4. Funcionamiento de los reactivos de SYBRGreen (Modificado de Applied Biosystem).

Las reacciones de PCR se realizaron en el aparato StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Madrid, Spain). El sistema StepOne recoge datos de fluorescencia brutos en diferentes puntos de una PCR. Un punto de recogida de datos o una lectura consta de tres fases:

- 1. Excitación:** el instrumento StepOne™ ilumina todos los pocillos de la placa de reacción para excitar los fluoróforos de cada reacción.
- 2. Emisión:** la óptica del instrumento StepOne capta la fluorescencia residual que se emite desde los pocillos de la placa de reacción. La imagen resultante que capta el dispositivo sólo consta de luz que se corresponde con el rango de las longitudes de onda de emisión.
- 3. Recogida:** el instrumento StepOne crea una representación digital de la fluorescencia residual recogida en un intervalo de tiempo fijado. El software StepOne™ almacena la imagen fluorescente bruta para analizarla.

Después de un proceso, el software StepOne utiliza datos de calibración (espacial, espectral y de fondo) para determinar la ubicación y la intensidad de las señales fluorescentes en cada lectura, el fluorocromo asociado a cada señal fluorescente y el significado de la señal.

Las sondas Taqman® empleadas estaban disponibles en el catálogo de Applied Biosystem y son las que se muestran en la tabla 2 en Anexos. La mayoría de ellas son complementarias a dos exones, para evitar la amplificación del posible DNA genómico residual en la muestra. Todas las reacciones se realizaron en un volumen final de 5 µl con 2X Taqman® universal PCR Fast Master mix (No AmpErase UNG, Applied Biosystems), 20X de la mezcla cebador/sonda Taqman® MGB específico para cada gen estudiado y 2 µl del cDNA diluido (1/10) obtenido tras la Retrotranscripción.

Para llevar a cabo la qRT-PCR con SYBR Green se optimizaron las parejas de cebadores mediante PCR convencional y su posterior visualización en gel de agarosa. Todas las reacciones se realizaron en un volumen final de 10 µl con 5 µl Fast SYBR® Green Master Mix 2x, 300nM de cada primer y 2 µl del cDNA diluido. Las parejas de cebadores empleados se recogen en la tabla 3 en Anexos.

Como genes normalizadores o housekeeping se emplearon dos genes endógenos, GAPDH y β-actina, cuya media geométrica se utilizó para corregir la expresión de los genes objeto de estudio [53]. Estos genes se seleccionaron basándose en estudios previos realizados por nuestro laboratorio, en función del tipo de tejido, para nuestro modelo animal [54]. Se estableció como grupo control los animales WT y la expresión relativa de RNA de cada grupo respecto al control se calculó empleando el método ΔΔCT [55].

4.6 - ANÁLISIS DE LOS DATOS Y ESTADÍSTICA

A la hora de procesar y analizar los resultados obtenidos en el presente trabajo, se utilizaron los programas informáticos que se enumeran a continuación:

- Para el análisis de secuencias y productos amplificados por la qRT-PCR se ha empleado el StepOneTM software v2.0. (Applied Biosystems).
- Paquete de Microsoft Office.
- Para el análisis estadístico se ha empleado el programa GraphPad Prism 5.
- Para la gestión de la revisión bibliográfica se ha empleado EndNote X5.

Los datos se presentan como la expresión media de cada grupo y las barras de error corresponden al error típico de la media. Para el análisis estadístico se emplearon las pruebas ANOVA (análisis de varianza) seguida de la prueba post-hoc *Turkey*. Las diferencias entre grupos se asumieron como significativas cuando el valor de p fue menor de 0.05 (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El apartado de resultados y discusión ha sido dividido en 3 subapartados, en los que se muestran la expresión génica en músculo de los procesos patológicos sobre los que se ha sospechado que el 5-FU pudiera tener un efecto beneficioso: proceso de autofagia (5.1), proceso apoptótico (5.2) y proceso inflamatorio (5.3).

5.1 EXPRESIÓN DE GENES DE AUTOFAGIA EN MÚSCULO

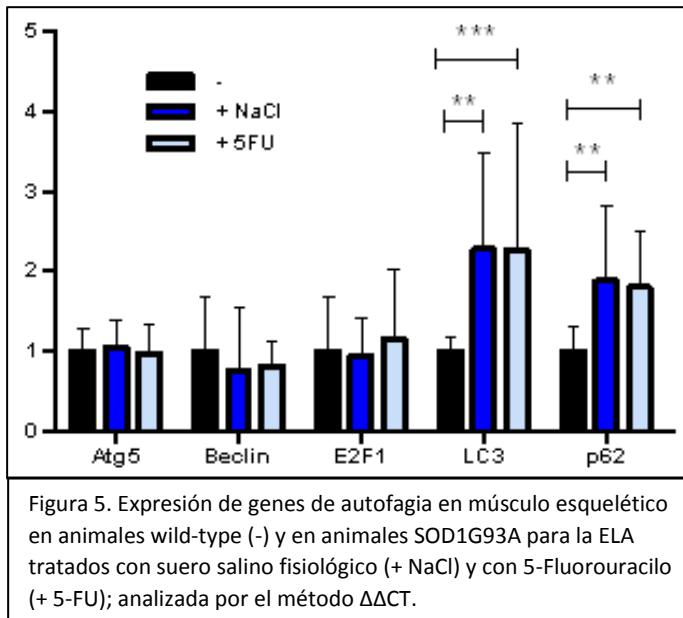
Como se ha explicado en el apartado de metodología, se ha cuantificado la expresión génica en músculo esquelético de los tres grupos de animales utilizados en este experimento: los animales no transgénicos (WT), los animales mSOD1 tratados con suero salino fisiológico (+NaCl) y los animales mSOD1 tratados con 5-Fluorouracilo (+5-FU). Habiéndose realizado de igual forma para la expresión de los procesos apoptótico e inflamatorio.

Se estudió la expresión de los genes de autofagia *Atg-5*, *Beclin*, *E2F1*, *LC3* y *p62* en el músculo esquelético de los tres grupos experimentales. En un primer momento se determinó si la expresión de alguno de los genes estaba aumentada en los animales transgénicos frente a sus homólogos WT; y en segundo lugar, si la administración de 5-FU provocaba una disminución de la expresión de dichos genes alterados en los animales modelo de la enfermedad.

Nuestros resultados indican que existen diferencias muy significativas entre animales WT y transgénicos, tanto tratados como sin tratar, en la expresión de los genes *LC3* y *p62* (*LC3*: $p<0.01$ 5 entre WT y +NaCl y $p<0.001$ entre WT y +5FU; *p62*: $p<0.01$ entre WT y +NaCl y $p<0.01$ entre WT y +5-FU) que son figuras claves en el proceso autofágico. Sin embargo, a pesar de que los animales tratados con el fármaco también mostraron diferencias significativas con el WT, no se observaron diferencias significativas en la expresión de los mismos entre los animales transgénicos tratados con suero salino fisiológico y los tratados con 5-FU. En la expresión génica del resto de genes estudiados no se observaron diferencias entre ninguno de los grupos analizados (Figura 5).

Los resultados obtenidos concuerdan con el de otros autores que describen una mayor inducción de la autofagia en los animales transgénicos frente a sus controles debido a mSOD1 [21]. Por otra parte, debido a que se comunicó en el último congreso mundial de ALS que el 5-FU bloquea la formación de agregados de mSOD1 en cultivos celulares que son eliminados mediante autofagia [50], se propuso buscar un posible efecto del fármaco sobre la expresión génica del proceso de autofagia en músculo, con el planteamiento de que el 5-FU pudiera afectar aumentando la supervivencia y mejorando los síntomas en ratones transgénicos para la mSOD1 humana.

No obstante, nuestros resultados muestran que la administración de 5-FU no está afectando el proceso autofágico en el músculo esquelético de nuestro modelo murino, en contraposición a lo esperado. Esto podría deberse a que el fármaco no actúe disminuyendo la expresión, sino aumentando la eficacia de eliminación de dichos agregados; o a que su efecto no sea a nivel de músculo esquelético.



5.2 EXPRESIÓN DE GENES DE APOPTOSIS EN MÚSCULO

Se realizó el estudio de la expresión de los genes de apoptosis *Bax*, *Bcl-2*, *Caspasa 1* y *Caspasa 3* en el músculo esquelético de los tres grupos experimentales. En un primer momento se determinó si la expresión de alguno de los genes estaba aumentada en los animales transgénicos frente a sus homólogos WT; y en segundo lugar, si la administración de 5-FU provocaba una disminución de la expresión de dichos genes alterados en los animales modelo de la enfermedad.

Nuestros resultados indican que existen diferencias significativas entre animales WT y transgénicos, tanto tratados como sin tratar, en la expresión de los genes *Bax* y *Caspasa 3* (*Bax*: $p<0.01$ entre WT y +NaCl y $p<0.01$ entre WT y +5-FU; *Caspasa 3*: $p<0.001$ entre WT y +NaCl y $p<0.001$ entre WT y +5-FU). Sin embargo, a pesar de que los animales tratados con el fármaco también mostraron diferencias significativas con el WT, no se observaron diferencias significativas en la expresión de los mismos entre los animales transgénicos tratados con suero salino fisiológico y los tratados con 5-FU. En la expresión génica del resto de genes estudiados no se observaron diferencias entre ninguno de los grupos analizados (Figura 6).

A pesar de que no existen estudios sobre la apoptosis asociada a una atrofia muscular en la ELA, sí se han realizado numerosos estudios sobre el SNC en el modelo murino para la mSOD1 humana en los que se han encontrado alteraciones en mitocondrias localizadas en dendritas y axones de

motoneuronas [26], así como agregados proteicos de mSOD1 en la membrana externa mitocondrial [27] que sugieren un papel principal de las mitocondrias en la apoptosis y degeneración neuronal. Sin embargo, la importancia de la apoptosis en músculo esquelético como posible mecanismo patológico desencadenante de la degeneración neuronal está basada en estudios en los que se sugiere un patrón retrógrado, en el que la degeneración y la atrofia muscular preceden a la muerte de la motoneurona, siendo dicha atrofia la que altera la unión neuromuscular produciendo a su vez una degeneración axonal retrógrada y la muerte neuronal [30]. Por tanto, nos interesó conocer el posible efecto beneficioso del 5-Fluorouracilo sobre dicha apoptosis en músculo esquelético.

Los resultados obtenidos indican un aumento en la expresión de *Bax* y *Caspasa 3*, relacionados con apoptosis en músculo esquelético de ratones mSOD1 respecto a los WT; estando en concordancia con las sospechas de otros estudios de que el aumento de la apoptosis no solo se produce en motoneuronas, sino también en músculo esquelético [30]. Contrariamente a lo esperado, no se observó el efecto del tratamiento sobre dicho proceso en el músculo esquelético de nuestro modelo murino.

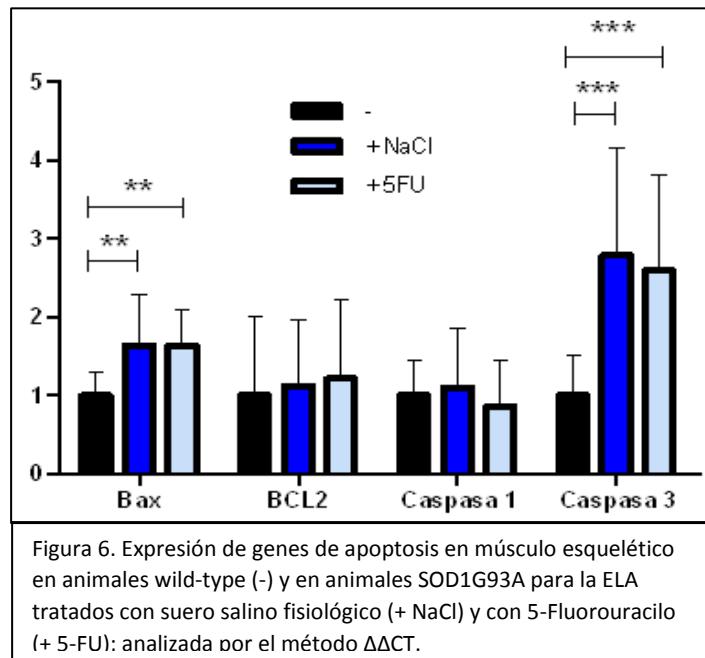


Figura 6. Expresión de genes de apoptosis en músculo esquelético en animales wild-type (-) y en animales SOD1G93A para la ELA tratados con suero salino fisiológico (+ NaCl) y con 5-Fluorouracilo (+ 5-FU); analizada por el método $\Delta\Delta CT$.

5.3 EXPRESIÓN DE GENES DE INFLAMACIÓN EN MÚSCULO

Se realizó el estudio de la expresión de los genes de inflamación *iNOS*, *TGF-β*, *TNF-α*, *CSF3R*, *CXCR4*, *CCR2* y *CCL2* en el músculo esquelético de los tres grupos experimentales. Como en los casos anteriores se determinó si la expresión de alguno de los genes estaba aumentada en los animales transgénicos frente a sus homólogos WT; así como si la administración de 5-FU provocaba una disminución de la expresión de dichos genes alterados en los animales modelo de la enfermedad.

Nuestros resultados indican que existen diferencias muy significativas entre animales WT y transgénicos, tanto tratados como sin tratar, en la expresión de los genes *TGF-β* y *CXCR4* (*TGF-β*:

$p<0.001$ entre WT y +NaCl y $p<0.001$ entre WT y +5-FU; *CXCR4*: $p<0.01$ entre WT y +NaCl y $p<0.01$ entre WT y +5-FU). Sin embargo, a pesar de que los animales tratados con el fármaco también mostraron diferencias significativas con el WT, no se observaron diferencias significativas en la expresión de los mismos entre los animales transgénicos tratados con suero salino fisiológico y los tratados con 5-FU. En la expresión génica de *iNOS*, *TNF- α* y *CSF3R* no se observaron diferencias entre ninguno de los grupos analizados (Figura 7).

Por otra parte, sí se encontraron diferencias significativas entre los animales mSOD1 tratados y no tratados, así como entre los mSOD1 tratados y los WT (*CCR2*: $p<0.05$ entre WT y +NaCl y $p<0.05$ entre WT y +5-FU) observándose una reducción en la expresión de *CCR2* en el grupo tratado respecto a los no tratados; además de observarse una tendencia en su ligando (*CCL2*), pero en este caso sin resultar significativa debido a la elevada variabilidad de la expresión de este gen en los animales, esta variabilidad puede ser consecuencia de la baja expresión del ligando en el músculo esquelético (Figura 8).

Se ha comprobado en un estudio de nuestro laboratorio que hay una disminución de linfocitos circulantes en animales mSOD1 hasta 4 días tras la administración del 5-FU, sugiriendo que pueda tener un efecto sobre la inflamación. No obstante, como ya se ha explicado previamente, cuando hablamos de inflamación en la ELA hablamos de neuroinflamación, no habiéndose realizado apenas estudios sobre la misma y el músculo; pero si se ha sugerido que la inflamación o neuroinflamación tiene un papel muy importante en la enfermedad, sospechándose que en la degeneración neuronal también participen células inflamatorias habiéndose hallado una correlación entre la activación de la microglía y la patogénesis muscular. De tal forma se sugiere que la inflamación contribuye a la aparición y progresión de los síntomas [31]. Cobra entonces vital importancia el estudio de la inflamación en el músculo, más si se tiene en cuenta, como se ha mencionado en apoptosis, los estudios que sugieren un patrón retrógrado en el que la degeneración y atrofia muscular precede a la muerte de la motoneurona [30], degeneración que podría deberse a la inflamación. Este ha sido nuestro argumento para buscar un posible efecto antiinflamatorio en músculo del 5-FU que explique la mejora de la enfermedad.

Nuestros resultados demuestran la presencia de un aumento de la inflamación en el músculo esquelético de ratones transgénicos respecto a nuestros animales WT, estando en concordancia con resultados previos de nuestro grupo con el gen *CXCR4* [56] y hallando, por primera vez, un aumento de la expresión génica de *TGF- β* en el modelo murino mSOD1. Estos resultados apoyarían la hipótesis planteada anteriormente de que la inflamación también podría tener un papel importante en músculo, incluso pudiendo ser el origen de la degeneración neuronal; creyéndose necesario la

continuación del estudio de este campo por su posible relevancia en la enfermedad, sobretodo en edades más tempranas con síntomas más leves.

Además, los resultados muestran también diferencias significativas en la expresión génica de *CCR2* en el músculo esquelético entre los animales mSOD1 tratados y no tratados, observándose una reducción en la expresión de dicho receptor en el grupo tratado respecto a los no tratados ($p<0.05$); diferencia no descrita en la bibliografía. Dichas diferencias en la expresión de *CCR2* parecen indicar que el 5-Fluorouracilo está modulando la expresión de dicho receptor; pudiendo ser necesaria la realización de más estudios para determinar la implicación de la vía CCL2/CCR2 en el mecanismo de acción del 5-FU.

Por otra parte, se ha descrito un incremento en la expresión génica de *CCL2* en líquido cefalorraquídeo tanto de pacientes con ELA, como en el modelo mSOD1 donde también se observó aumento de *CCR2* [57]. A pesar de las diferencias encontradas en la expresión de *CCR2* entre animales mSOD1 tratados y no tratados, no se encontraron diferencias significativas entre los WT y los ratones mSOD1 sin tratar; las discrepancias con el estudio anterior [57] pueden ser debidas al número de muestras o a su variabilidad; observándose, sin embargo, una tendencia en la expresión tanto del receptor como del ligando.

CCR2 es el receptor de *CCL2* o MCP-1, la cual es una proteína implicada en la quimiotaxis de monocitos, macrófagos y microglía, lo que conduce a una microglisis patológica y a la activación de la respuesta inflamatoria. La disminución de la expresión de estos genes tras el tratamiento puede indicar que estos procesos están disminuidos y, por tanto, el músculo esquelético estaría más protegido.

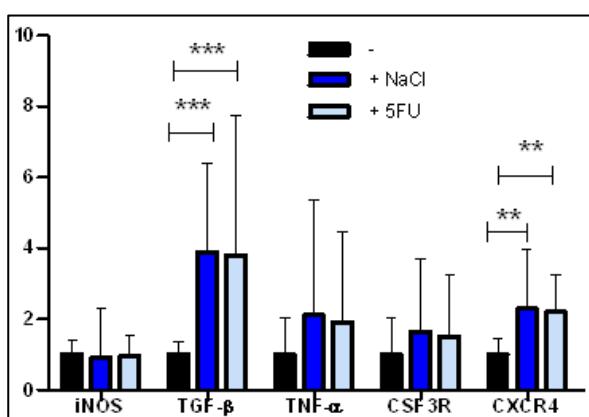


Figura 7. Expresión de genes de inflamación en músculo esquelético en animales wild-type (-) y en animales SOD1G93A para la ELA tratados con suero salino fisiológico (+ NaCl) y con 5-Fluorouracilo (+ 5-FU); analizada por el método $\Delta\Delta CT$.

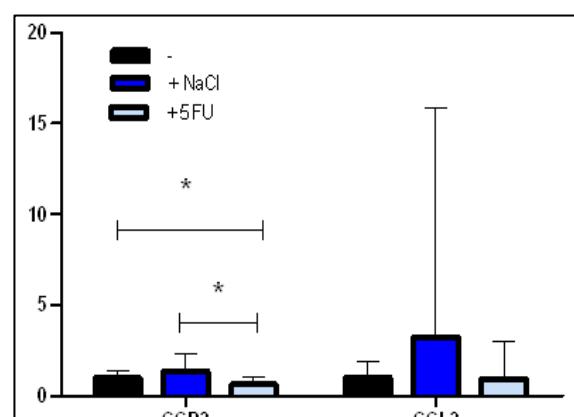


Figura 8. Expresión de genes de inflamación en músculo esquelético en animales wild-type (-) y en animales SOD1G93A para la ELA tratados con suero salino fisiológico (+ NaCl) y con 5-Fluorouracilo (+ 5-FU); analizada por el método $\Delta\Delta CT$.

6. CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos y bajo nuestras condiciones experimentales, podemos deducir las siguientes conclusiones:

1. La expresión de determinados genes relacionados con los procesos de autofagia y apoptosis se encuentra incrementada respecto a sus controles en estado sintomático tras la aplicación del tratamiento con el quimioterápico 5-Fluorouracilo.
2. La expresión de determinados genes relacionados con la respuesta inflamatoria, se encuentra incrementada en el músculo esquelético del modelo murino de ELA SOD1G93A respecto a sus controles en estado sintomático tras la aplicación del tratamiento con el quimioterápico 5-Fluorouracilo.
3. El agente quimioterápico 5-Fluorouracilo modula la vía inflamatoria CCL2/CCR2, reduciendo la expresión génica de dicho receptor en el músculo esquelético del modelo murino de ELA SOD1G93A, pudiendo estar implicado en la mejora de la enfermedad tras el tratamiento.

CONCLUSIONS

Under our experimental conditions and taking into account the results obtained, we can conclude:

1. The expression of certain genes related to autophagy and apoptosis processes is increased compared to controls in symptomatic state after applying the treatment with the chemotherapeutic agent 5-Fluorouracil.
2. The expression of certain genes related to inflammatory response, is increased in the skeletal muscle of the ALS murine model SOD1G93A compared to their controls in symptomatic state after applying the treatment with the chemotherapeutic agent 5-fluorouracil.
3. The chemotherapeutic agent 5-Fluorouracil modulates the CCL2/CCR2 inflammatory pathway, reducing the genetic expression of this receptor in the skeletal muscle of the ALS murine model SOD1G93A, and this pathway may be involved in the improvement of the disease after the treatment.

7. VALORACIÓN PERSONAL

Hablando ya en términos personales, ha sido para mí un placer enorme el poder realizar dicho Trabajo de Fin de Grado en el departamento de genética con la Dra. Rosario Osta Pinzolas y la Dra. Amaya Rando Zalduendo, ya que me han permitido conocer e introducirme en el mundo de la investigación y comenzar a crear o poner mi granito de arena en el descubrimiento de la ciencia, en este caso de la ELA, que me parece una enfermedad con una importancia creciente y con muchas incógnitas a la que se debería dar aún más importancia sobre todo por el número creciente de casos. Además he podido participar de primera mano en un experimento, teniendo contacto con animales de experimentación y pudiendo comenzar a realizar ciertas técnicas laboratoriales como la extracción de RNA o la realización de PCRs a tiempo real con sondas Taqman y con SYBRGreen; además de aprender a buscar, seleccionar y gestionar la búsqueda de artículos científicos.

En resumen creo que con este trabajo he aprendido como se trabaja en la investigación, así como sus pros y sus contras, habiendo conseguido estar más formado y preparado para seguir por este duro y gratificante camino que es seguir investigando. Aprendizaje y formación que he conseguido gracias a mis directoras, ya que ambas me han ayudado mucho y no solo para conseguir un buen Trabajo de Fin de Grado; sino para ser mejor profesional en este campo.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Gordon, P.H., *Amyotrophic Lateral Sclerosis: An update for 2013 Clinical Features, Pathophysiology, Management and Therapeutic Trials*. Aging Dis, 2013. 4(5): p. 295-310.
2. Ferraiuolo, L., et al., *Molecular pathways of motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis*. Nat Rev Neurol, 2011. 7(11): p. 616-30.
3. Al-Chalabi, A. and O. Hardiman, *The epidemiology of ALS: a conspiracy of genes, environment and time*. Nat Rev Neurol, 2013. 9(11): p. 617-28.
4. Andersen, P.M., *Amyotrophic lateral sclerosis associated with mutations in the CuZn superoxide dismutase gene*. Curr Neurol Neurosci Rep, 2006. 6(1): p. 37-46.
5. Robberecht, W. and T. Philips, *The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis*. Nat Rev Neurosci, 2013. 14(4): p. 248-64.
6. Van Damme, P., et al., *Excitotoxicity and amyotrophic lateral sclerosis*. Neurodegener Dis, 2005. 2(3-4): p. 147-59.
7. Vande Velde, C., et al., *Selective association of misfolded ALS-linked mutant SOD1 with the cytoplasmic face of mitochondria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(10): p. 4022-7.
8. De Vos, K.J., et al., *Familial amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutants perturb fast axonal transport to reduce axonal mitochondria content*. Hum Mol Genet, 2007. 16(22): p. 2720-8.
9. Musaro, A., *State of the art and the dark side of amyotrophic lateral sclerosis*. World J Biol Chem, 2010. 1(5): p. 62-8.
10. Harraz, M.M., et al., *SOD1 mutations disrupt redox-sensitive Rac regulation of NADPH oxidase in a familial ALS model*. J Clin Invest, 2008. 118(2): p. 659-70.
11. Kabashi, E., et al., *Oxidized/misfolded superoxide dismutase-1: the cause of all amyotrophic lateral sclerosis?* Ann Neurol, 2007. 62(6): p. 553-9.
12. Bendotti, C., et al., *Dysfunction of constitutive and inducible ubiquitin-proteasome system in amyotrophic lateral sclerosis: implication for protein aggregation and immune response*. Prog Neurobiol, 2012. 97(2): p. 101-26.
13. Johnson, B.S., et al., *TDP-43 is intrinsically aggregation-prone, and amyotrophic lateral sclerosis-linked mutations accelerate aggregation and increase toxicity*. J Biol Chem, 2009. 284(30): p. 20329-39.
14. Wong, E. and A.M. Cuervo, *Integration of clearance mechanisms: the proteasome and autophagy*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. 2(12): p. a006734.
15. Mukhopadhyay, S., et al., *Autophagy and apoptosis: where do they meet?* Apoptosis, 2014. 19(4): p. 555-66.
16. Mizushima, N. and M. Komatsu, *Autophagy: renovation of cells and tissues*. Cell, 2011. 147(4): p. 728-41.
17. Chen, Y. and D.J. Klionsky, *The regulation of autophagy - unanswered questions*. J Cell Sci, 2011. 124(Pt 2): p. 161-70.
18. Hochfeld, W.E., S. Lee, and D.C. Rubinsztein, *Therapeutic induction of autophagy to modulate neurodegenerative disease progression*. Acta Pharmacol Sin, 2013. 34(5): p. 600-4.
19. Fornai, F., et al., *Lithium delays progression of amyotrophic lateral sclerosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(6): p. 2052-7.
20. Venkatachalam, K., et al., *Motor deficit in a Drosophila model of mucolipidosis type IV due to defective clearance of apoptotic cells*. Cell, 2008. 135(5): p. 838-51.

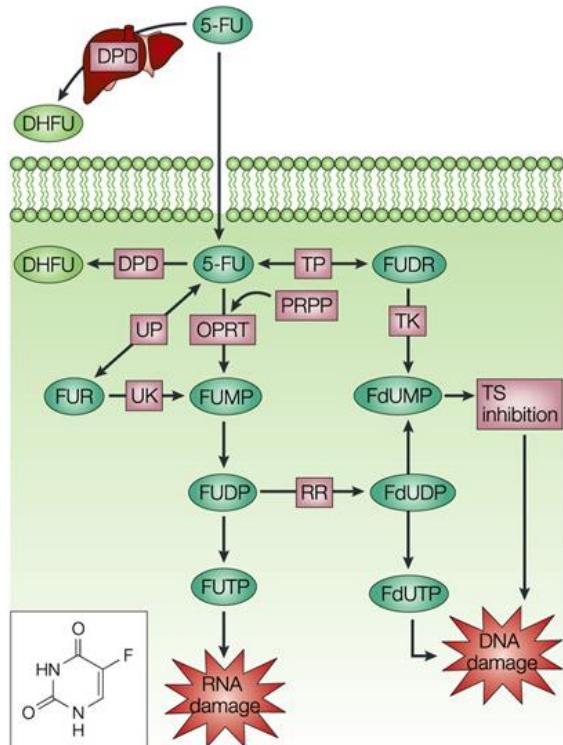
21. Onesto, E., et al., *Muscle cells and motoneurons differentially remove mutant SOD1 causing familial amyotrophic lateral sclerosis*. J Neurochem, 2011. 118(2): p. 266-80.
22. Oliván, S., et al., *Time-Point Dependent Activation of Autophagy and the UPS in SOD1G93A Mice Skeletal Muscle*. PLoS One, 2015. 10(8): p. e0134830.
23. Marino, G., et al., *Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. 15(2): p. 81-94.
24. Galluzzi, L., et al., *Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012*. Cell Death Differ, 2012. 19(1): p. 107-20.
25. Galluzzi, L., O. Kepp, and G. Kroemer, *Mitochondria: master regulators of danger signalling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. 13(12): p. 780-8.
26. Kong, J. and Z. Xu, *Massive mitochondrial degeneration in motor neurons triggers the onset of amyotrophic lateral sclerosis in mice expressing a mutant SOD1*. J Neurosci, 1998. 18(9): p. 3241-50.
27. Pedrini, S., et al., *ALS-linked mutant SOD1 damages mitochondria by promoting conformational changes in Bcl-2*. Hum Mol Genet, 2010. 19(15): p. 2974-86.
28. Fischer, L.R. and J.D. Glass, *Axonal degeneration in motor neuron disease*. Neurodegener Dis, 2007. 4(6): p. 431-42.
29. Reyes, N.A., et al., *Blocking the mitochondrial apoptotic pathway preserves motor neuron viability and function in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis*. J Clin Invest, 2010. 120(10): p. 3673-9.
30. Oliván, S., *Alteración de la autofagia y su modulación por una dieta rica en lípidos en un modelo murino de Esclerosis Lateral Amiotrófica*, in *Anatomía, Embriología y Genética Animal*.2014, Universidad de Zaragoza: Zaragoza.
31. Ilieva, H., M. Polymenidou, and D.W. Cleveland, *Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond*. J Cell Biol, 2009. 187(6): p. 761-72.
32. Poppe, L., et al., *Translating biological findings into new treatment strategies for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)*. Exp Neurol, 2014. 262 Pt B: p. 138-51.
33. Rizzo, F., et al., *Cellular therapy to target neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis*. Cell Mol Life Sci, 2014. 71(6): p. 999-1015.
34. Henkel, J.S., et al., *Microglia in ALS: the good, the bad, and the resting*. J Neuroimmune Pharmacol, 2009. 4(4): p. 389-98.
35. Dupuis, L., et al., *Evidence for defective energy homeostasis in amyotrophic lateral sclerosis: benefit of a high-energy diet in a transgenic mouse model*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(30): p. 11159-64.
36. Dupuis, L. and A. Echaniz-Laguna, *Skeletal muscle in motor neuron diseases: therapeutic target and delivery route for potential treatments*. Curr Drug Targets, 2010. 11(10): p. 1250-61.
37. Gonzalez de Aguilar, J.L., et al., *Gene profiling of skeletal muscle in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model*. Physiol Genomics, 2008. 32(2): p. 207-18.
38. Williams, A.H., et al., *MicroRNA-206 delays ALS progression and promotes regeneration of neuromuscular synapses in mice*. Science, 2009. 326(5959): p. 1549-54.
39. Zhou, J., et al., *Hyperactive intracellular calcium signaling associated with localized mitochondrial defects in skeletal muscle of an animal model of amyotrophic lateral sclerosis*. J Biol Chem, 2010. 285(1): p. 705-12.
40. Krakora, D., C. Macrander, and M. Suzuki, *Neuromuscular junction protection for the potential treatment of amyotrophic lateral sclerosis*. Neurol Res Int, 2012. 2012: p. 379657.

41. Rando, A., *Terapia celular en un modelo murino de Esclerosis Lateral Amiotrófica: trasplante y/o movilización de células endógenas*, in *Anatomía, Embriología y Genética Animal*.2015, Universidad de Zaragoza: Zaragoza.
42. Buccchia, M., et al., *Therapeutic development in amyotrophic lateral sclerosis*. Clin Ther, 2015. 37(3): p. 668-80.
43. Mojardin, L., et al., *New insights into the RNA-based mechanism of action of the anticancer drug 5'-fluorouracil in eukaryotic cells*. PLoS One, 2013. 8(11): p. e78172.
44. Zhang, Y., G. Talmon, and J. Wang, *MicroRNA-587 antagonizes 5-FU-induced apoptosis and confers drug resistance by regulating PPP2R1B expression in colorectal cancer*. Cell Death Dis, 2015. 6: p. e1845.
45. De la Cueva, A., *Combinatoria de 5-fluorouracilo y cisplatino con inhibidores de colina quinasa α como nueva alternativa terapéutica en cáncer de colon y en cáncer de pulmón no microcítico*, in *Departamento de Biología Molecular2012*, Universidad Autónoma de Madrid: Madrid.
46. Grem, J.L., *Mechanisms of Action and Modulation of Fluorouracil*. Semin Radiat Oncol, 1997. 7(4): p. 249-259.
47. Longley, D.B., D.P. Harkin, and P.G. Johnston, *5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies*. Nat Rev Cancer, 2003. 3(5): p. 330-8.
48. Filgueiras Mde, C., et al., *Effects of 5-fluorouracil in nuclear and cellular morphology, proliferation, cell cycle, apoptosis, cytoskeletal and caveolar distribution in primary cultures of smooth muscle cells*. PLoS One, 2013. 8(4): p. e63177.
49. Santos-Garcia, D., J.M. Prieto, and M. Lema, [Clinical course of multiple sclerosis in patients treated with cytostatic drugs for cancer]. Rev Neurol, 2009. 48(2): p. 71-4.
50. Airey D, G.L., Vieira F, Cashman N., *Small molecules that block propagation of sod1 misfolding in living cells*. Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration, 2014. 14: p. 1-56.
51. Amante, D.J., et al., *Uridine ameliorates the pathological phenotype in transgenic G93A-ALS mice*. Amyotroph Lateral Scler, 2010. 11(6): p. 520-30.
52. Truett, G.E., et al., *Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT)*. Biotechniques, 2000. 29(1): p. 52, 54.
53. Vandesompele, J., et al., *Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes*. Genome Biol, 2002. 3(7): p. RESEARCH0034.
54. Calvo, A.C., et al., *Determination of protein and RNA expression levels of common housekeeping genes in a mouse model of neurodegeneration*. Proteomics, 2008. 8(20): p. 4338-43.
55. Schmittgen, T.D. and K.J. Livak, *Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method*. Nat Protoc, 2008. 3(6): p. 1101-8.
56. Manzano, R., et al., *Altered expression of myogenic regulatory factors in the mouse model of amyotrophic lateral sclerosis*. Neurodegener Dis, 2011. 8(5): p. 386-96.
57. Kawaguchi-Niida, M., et al., *MCP-1/CCR2 signalling-mediated astrogliosis is accelerated in a transgenic mouse model of SOD1-mutated familial ALS*. Acta Neuropathol Commun, 2013. 1: p. 21.

ANEXOS

Target	Drug	Preclinical	Clinical Phase I	Clinical Phase II	Clinical Phase III
Mitochondria	Dexpramipexole	Reduces neuronal death, inhibiting aberrant mitochondrial leak conductance, Maintains/increases ATP production, Decreases oxygen consumption			failed end point 
	Rasagiline (Azilect)	Inhibits MAO-B, enhancer of mitochondrial viability and stabilizer of permeability transition		Safety profile and efficacy evaluation	
Immuno-modulation (T-cell modulators)	Fingolimod (Gilenya)	Sphingosine 1-phosphate receptor agonist that blocks T cells in lymph nodes		Safety profile and tolerability evaluation	
	CDP7657	Anti-CD40L that reduces activation of T cells	Immu-modulation		
Immuno-modulation (Macrophage modulators)	Tocilizumab	IL-6 receptor antibody that reduces activation of macrophages (monocytes and T cells)		Safety profile and tolerability evaluation	
	NP001	It reduces macrophage activation		Well tolerated and tolerability evaluation	
Autophagy	Lithium Carbonate	It may boost autophagy-clearing misfolded proteins		Safety profile and efficacy evaluation	
Mast cells	Masitinib (AB1010)	Kinase inhibitor that targets the stem cell factor receptor, KIT. It blocks mast cell-mediated degranulation, cytokine production, and mast cell migration		Safety profile and efficacy evaluation	
Astroglial and microglial cells	Fasudil	ROCK inhibitor that reduces astroglial and microglial cell infiltration of the spinal cord		Safety profile and efficacy evaluation	
Motor neurons	GSK2606414	Reducing accumulation of TDP-43	PERK inhibitor that reduces motor neuron loss		
	Kenpaullone	Reducing SOD1 protein aggregates	GSK-3 inhibitor that reduces neuronal apoptosis 1		
	Neurimmune NI-204	Targeting of misfolded SOD1	Antibody directed to misfolded SOD1 reduces its accumulation within motor neurons		
	SOD1RX		Safety profile and tolerability evaluation	Antisense RNA directed to the SOD1 gene to reduce the accumulation of misfolded SOD1	
	Antisense C9orf72	Well tolerated in mice	Antisense oligonucleotides against C9orf72 inclusions		
	Nuedexta	Against sigma 1 receptor of neuronal cells, it can help to reduce PBA		Safety profile and efficacy evaluation	
Astrocytes	Astrocytes replacement therapy	Increasing survival in mouse model	Cell therapy to replace toxic astrocytes		
Motor neurons and astrocytes	Neural stem cell therapy	Cell therapy as a tool for cell replacement	Well tolerated in patients, Phase II planned		
Neuromuscular junctions	Ozanezumab	Against NOGO-A protein, it can repair and reconnect motor nerves and muscle fibers		Safety profile and efficacy evaluation	
Neurons	Mexitetine	It reduces hyperexcitability through sodium channel inhibition		Safety profile and efficacy evaluation	
	APY, KYL, and VTM	MN survival increases	Regulator of the regeneration of the central nervous system acting against EphA4 receptor		
Fast skeletal muscles	Tirasemvit	Troponin activator that modulates muscle contractility		Safe and tolerable. Phase IIb started	

Tabla 1. Ensayos clínicos de Terapias farmacológicas para la ELA actualmente en curso [42].



Nature Reviews | Cancer

Figura 1. Metabolismo del 5-FU y efectos de sus metabolitos activos [47].

Gen Symbol	Part Number
Atg5	Mm00504340_m1
Bclin	Mm00517174_m1
E2F1	Mm00432939_m1
LC3	Mm00458724_m1
p62	Mm00448091_m1
Bax	Mm 00432050_m1
BCL2	Mm 00477631_m1
Caspasa 1	Mm 00438023_m1
Caspasa 3	Mm 01195085_m1
CSF3R	Mm00432735_m1
CXCR4	Mm01996749_s1
CCR2	Mm01216173_m1
CCL2	Mm00441242_m1

Tabla 2. Sondas Taqman® empleadas en la realización de este Trabajo de Fin de Grado.

Genes	Secuencia		Annealing temperature	Referencia
	Forward (5' → 3')	Reverse (5' → 3')		
<i>GAPDH</i>	AGGTGGTGTGAACGGATTG	GGGGTCGTTGATGGCAACA	60	Jon J et al 2013
<i>b-actin</i>	AGAGGGAAATCGTGCCTGAC	CAATAGTGATGACCTGGCCGT	60	Jon J et al 2013
<i>TNF-α</i>	TATGGCCCAGACCTCACA	GGAGTAGACAAGGTACAACCCATC	60	Wang et al 2014
<i>TGF-β</i>	GTGTGGAGAACATGTGAACTCTA	TTGGTTCAGCCACTGCCGTA	60	Wang et al 2014
<i>iNOS</i>	CAG CTG GGC TGT ACA AAC CTT	CAT TGG AAG TGA AGC GTT TCG	60	Wang et al 2014

Tabla 3. Parejas de cebadores empleadas en la realización de dicho Trabajo de Fin de Grado.