



UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas  
Departamento de Bioquímica y biología Molecular

**“Caracterización de la autofagia mediada por chaperonas (CMA) en el control del crecimiento axonal de motoneuronas NSC-34 en condiciones fisiológicas y de agregación de la proteína TDP-43”**

Memoria para optar al Título Profesional de Bioquímico

**José Manuel Moreno Paz**

PROFESOR PATROCINANTE  
Dra. Valentina M. Parra Ortiz  
Facultad de Ciencias Químicas y  
Farmacéuticas  
Universidad de Chile

DIRECTOR DE TESIS  
Dr. Mauricio F. Budini.  
Facultad de Odontología  
Universidad de Chile

SANTIAGO, CHILE  
2021

Esta memoria de título se desarrolló en el laboratorio de Patología Celular y Molecular, dirigido por el Dr. Mauricio Budini quien pertenece al Instituto de Investigación en Ciencias Odontológicas de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

Esta tesis contó con financiamiento del proyecto FONDECYT N°1161123.

Durante el desarrollo de esta memoria de título se concretaron las siguientes actividades:

❖ **Presentaciones a congresos:**

**Moreno J**, Ormeño F, Ivan Alfaro, Budini M.

Regulation of NF-H protein levels and cellular localization by Chaperone Mediated Autophagy in a Motor Neuron cell line model.

XXXI Reunión anual Sociedad de Biología Celular de Chile

Sesión de posters. Puerto Varas, octubre 2018.

**Moreno J**, Ormeño F, Riquelme F, Corvalán D, Budini M.

TDP-43 aggregation affects Chaperone Mediated Autophagy (CMA) pathway.

XL Reunión anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile.

Sesión de posters. Puerto Varas, octubre 2017.

Riquelme F, **Moreno J**, Ormeño F, Pino S, Budini M.

Relationship between TDP-43 aggregates and CMA.

XXIX Reunión anual Sociedad de Biología Celular de Chile

Sesión de posters. Puerto Varas, octubre 2016.

❖ **Publicaciones:**

Fernando Ormeño, Juan Hormazabal, **José Moreno**, Felipe Riquelme, Javiera Rios, Alfredo Criollo, Amelina Albornoz, Iván E. Alfaro and Mauricio Budini. "Chaperone mediated autophagy degrades TDP-43 protein and is affected by TDP-43 aggregation" ORIGINAL RESEARCH ARTICLE Front. Mol. Neurosci. | doi: 10.3389/fnmol.2020.00019

Iván E. Alfaro, Amelina Albornoz, Alfredo Molina, **José Moreno**, Karina Cordero, Alfredo Criollo and Mauricio Budini. "Chaperone Mediated Autophagy in the Crosstalk of Neurodegenerative Diseases and Metabolic Disorders" REVIEW ARTICLE Front. Endocrinol., 31 January 2019 <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00778>

## **AGRADECIMIENTOS**

A mí Familia (5), Lía y Martín

Al profesor Mauricio Budini y a todo el equipo de laboratorio, Fernando Ormeño, Felipe Riquelme, Katherine Vera.

## INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	IV
INDICE DE FIGURAS.....	VII
INDICE DE TABLAS.....	VIII
ABREVIATURAS.....	IX
RESUMEN.....	XI
SUMMARY.....	XIII
INTRODUCCIÓN.....	2
1.    CMA y neurodegeneración.....	2
2.    Enfermedades Neurodegenerativas (ND).....	3
2.1    Características de las enfermedades neurodegenerativas.....	3
3.    Esclerosis Lateral Amiotrófica (ALS).....	5
3.1.    Características de la enfermedad.....	5
3.2.    Características epidemiológicas.....	6
3.3.    Características patológicas.....	7
3.4.    Características genéticas.....	8
3.5.    ALS y neurofilamentos.....	9
4.    ALS y TDP-43.....	11
5.    Autofagia: Vía de eliminación y control proteico.....	12
5.1.    Autofagia.....	12
5.2.    Macroautofagia.....	13
5.3.    Microautofagia.....	14
5.4.    Autofagia mediada por chaperonas (CMA).....	14
6.    NSC-34 como modelo de estudio de ALS.....	16
7.    Tema de estudio de la tesis:.....	17
HIPÓTESIS.....	19
OBJETIVOS.....	19
8.    OBJETIVO GENERAL.....	19
9.    OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
10.    Línea celular de motoneuronas NSC-34.....	20
11.    Diferenciación de la línea celular NSC-34.....	20

12.	Estímulo de activación de la CMA.....	21
13.	Infección de la línea celular NSC-34 (Knock-down LAMP2A).....	21
14.	Inmunofluorescencia indirecta.....	21
15.	Preparación de extractos celulares totales.....	22
16.	Aislamiento de la fracción citosólica S100 para evaluar actividad..... CMA.....	23
17.	Transcripción reversa (RT) y reacción en cadena de polimerasa..... (qPCR).....	23
18.	Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	25
19.	Electrotransferencia de proteínas.....	25
20.	Western blot.....	25
21.	Análisis estadísticos.....	26
RESULTADOS.....		27
22.	Actividad de la vía de autofagia mediada por chaperonas..... Proteína LAMP2A, la componente clave.....	27
23.	Estímulo y evaluación de la activación de la vía CMA.....	27
24.	Actividad de la autofagia mediada por chaperonas en el . crecimiento axonal.....	30
25.	Caracterización del crecimiento axonal en la línea celular NSC-34.	31
26.	Evaluación de la activación de la CMA durante el crecimiento..... axonal.....	33
27.	Línea celular con baja expresión de proteína LAMP2A para ..... determinar crecimiento axonal.....	34
28.	Determinación del crecimiento axonal en células NSC-34 con..... baja expresión de proteína LAMP2A.....	37
29.	Caracterización de la línea celular NSC-34-GFP-TDP-25.....	39
30.	Efecto del agregado TDP-25 en la actividad CMA.....	39
31.	Efecto del agregado TDP-25 en los niveles de la subunidad..... pesada de neurofilamento (NF-H).....	41
32.	Afecto del agregado TDP-25 en el crecimiento axonal.....	43
DISCUSIÓN.....		45
CONCLUSIÓN.....		48
33.	Figuras complementarias.....	49
BIBLIOGRAFÍA.....		50

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Neurodegeneración.....	2
<b>Figura 2.</b> Atrofia muscular progresiva, debilidad de músculos del cuello.....	5
<b>Figura 3.</b> El sistema motor.....	7
<b>Figura 4.</b> Ensamblaje del neurofilamento.....	9
<b>Figura 5.</b> Principales estructuras de las subunidades de neurofilamentos (NFs).....	10
<b>Figura 6.</b> Representación esquemática de la estructura y funciones celulares reguladas... por TDP-43.....	11
<b>Figura 7.</b> Tipos de autofagia en mamíferos.....	13
<b>Figura 8.</b> Representación esquemática de los principales procesos de autofagia..... mediada por chaperonas (CMA).....	15
<b>Figura 9A.</b> Células NSC-34 en 10 % (v/v) de FBS.....	16
<b>Figura 9B.</b> Células NSC-34 en 0,5 % (v/v) de FBS.....	16
<b>Figura 10.</b> Activación de la CMA en la línea celular de motoneuronas NSC-34.....	29
<b>Figura 11.</b> Crecimiento axonal en la línea celular de motoneuronas NSC-34.....	32
<b>Figura 12.</b> Efecto de la actividad de la vía de autofagia mediada por chaperonas..... en el crecimiento axonal.....	34
<b>Figura 13.</b> Células knock-down CMA.....	36
<b>Figura 14.</b> Determinación del crecimiento axonal en células con baja actividad CMA.....	38
<b>Figura 15.</b> Efecto del agregado TDP-25 en la actividad CMA.....	40
<b>Figura 16.</b> Efecto del agregado TDP-25 en la proteína NF-H (Western blot).....	42
<b>Figura 17.</b> Efecto del agregado TDP-25 en la proteína NF-H (Inmunofluorescencia).....	44
<b>Figura 18.</b> Figura resumen.....	47

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Procesos en común asociados a enfermedades neurodegenerativas.....	3
<b>Tabla 2.</b> Enfermedades neurodegenerativas más comunes.....	4
<b>Tabla 3.</b> Distribución de la enfermedad en la población chilena según género.....	6
<b>Tabla 4.</b> Población nacional diagnosticada con ALS.....	6
<b>Tabla 5.</b> Principales genes que provocan ALS.....	8
<b>Tabla 6.</b> Secuencias homólogas a KFERQ.....	18
<b>Tabla 7.</b> Programa de amplificación cDNA.....	24
<b>Tabla 8.</b> Anticuerpos utilizados inmunofluorescencia.....	26

## ABREVIATURAS

ALS	: Esclerosis lateral amiotrófica
ANOVA	: Análisis de varianza
BSA	: Albúmina de suero bovino
cDNA	: Acido desoxirribonucleico complementario
CMA	: Autofagia mediada por chaperonas
ECL	: Potenciador de quimioluminiscencia
EDTA	: Ácido etilendiaminotetraacético
FBS	: Suero Fetal Bovino
FTLD	: Demencia Lobar Frontotemporal
GAPDH	: Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
GFP	: Proteína fluorescente verde
h	: horas
HD	: Enfermedad de Huntington
HSC70	: Proteína de choque térmico relacionada a proteínas de 70 kDa
kDa	: kilo Dalton
KFERQ	: motivo de reconocimiento (Lys;Phe;Glu;Arg;Gln)
LAMP2A	: Proteína de membrana tipo 2 asociada a lisosomas
Lys-HSC70	: Proteína de choque térmico relacionada a proteínas de 70 kDa luminal
mi-RNA	: micro Ácido Ribonucleico
M-MLV RT	: Transcriptasa reversa del virus murina Moloney de leucemia.
MN	: Motoneurona
mRNA	: Ácido Ribonucleico mensajero
NES	: Secuencia de Exportación Nuclear
NF-H	: Cadena pesada del Neurofilamento
NF-L	: Cadena liviana del Neurofilamento
NF-M	: Cadena media del Neurofilamento
NLS	: Secuencia de Localización Nuclear
NSC-34	: Línea Celular híbrida semejante a Motoneurona de ratón
PBS	: Amortiguador Fosfato Salino

PD	: Enfermedad de Parkinson
PDL	: Poli-D-Lisina
p-NF-H	: Cadena pesada del Neurofilamento fosforilado
qPCR	: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RMM1	: Motivo de reconocimiento de RNA 1
RMM2	: Motivo de reconocimiento de RNA 2
RT	: Retro transcriptasa
SDS-PAGE	: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
shGFPEMPTY	: Vector lentiviral horquilla acoplado a GFP (control)
shGFPmLAMP2A	: Vector Lentiviral horquilla acoplado a GFPLAMP2A mouse
shRNA	: Ácido ribonucleico horquilla
SMI-32	: Anticuerpo no fosforilado anti NF-H
SNC	: Sistema Nervioso Central
TARDBP	: Proteína de unión a DNA (del inglés Trans-activation response DNA binding protein)
TBS TWEEN	: Amortiguador salino con Tween 20
TDP-25	: Proteína de 25 kDa de unión a DNA
TDP-43	: Proteína de 43 kDa de unión a DNA
Tris-HCL	: Amortiguador ácido tris(hidroximetil)aminometano
WT	: Fenotipo salvaje
rpm	: Revoluciones por minuto
µg	: Microgramo
µL	: Microlitro
µm	: Micrómetro
nm	: Nanómetro

## RESUMEN

La autofagia mediada por chaperonas (CMA) es una vía lisosomal de degradación de proteínas que, en ocasiones, puede presentar un desbalance en su actividad y provocar una incorrecta homeostasis proteica. Múltiples publicaciones muestran que podría existir una relación directa entre un desbalance en la actividad CMA y aparición de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, Parkinson o Huntington. Sin embargo, poco se conoce respecto al estado de la CMA en otras enfermedades neurodegenerativas como la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA o ALS del inglés “Amyotrophic Lateral Sclerosis”), la cual se caracteriza por la degeneración de motoneuronas motoras de la corteza y la médula espinal. Algunos estudios han demostrado que el crecimiento axonal de motoneuronas de pacientes con ALS contienen agregados citoplasmáticos de la proteína TDP-43 (Transactivating Response Región (TAR) DNA binding Protein). La agregación de esta proteína en motoneuronas daría cuenta de una pérdida de su función, lo que estaría directamente relacionado con la aparición de enfermedades neurodegenerativas como ALS. Por otro lado, estudios de nuestro laboratorio demostraron que TDP-43 es un sustrato de CMA y además que, agregados de TDP-43 podrían afectar la actividad de esta vía. Adicionalmente, mediante análisis realizados *in silico*, pudimos observar que proteínas importantes para la formación y estabilidad del axón, como las subunidades de neurofilamentos, podrían también ser sustratos de CMA. Considerando estos antecedentes, quisimos caracterizar la función de la actividad de la CMA en el crecimiento axonal de la línea celular NSC-34 (del inglés Mouse Motor Neuron-Like Hybrid Cell Line) y su relación con la agregación de TDP-43.

Pudimos observar que las células NSC-34 responden a estímulos de activación e inhibición de CMA. Además, en el proceso de diferenciación, donde las células extienden sus axones y neuritas observamos un aumento en los niveles de GAPDH (un clásico sustrato de CMA), indicando una inhibición de la actividad CMA. Reafirmando esta idea, la reducción de LAMP2A (proteína clave en la actividad de CMA) mediante utilización de un shRNA específico condujo a crecimiento axonal prematuro de las células, comparadas con las células control. En cuanto a los neurofilamentos se observó que, la subunidad NF-H co-localizó con lisosomas positivos a LAMP2A en estadios tempranos de diferenciación, sugiriendo que esta subunidad de neurofilamento podría ser sustrato de esta vía de degradación proteica durante esta etapa. Sin embargo, dicha co-localización disminuyó cuando las células diferenciadas extendieron sus neuritas y

axones, sugiriendo que NF-H “escaparía” a la degradación de CMA durante la formación del axón. Apoyando esta idea, los niveles proteicos de NF-H aumentaron cuando las células se sometieron a diferenciación y también en las células con niveles de LAMP2A reducidos por el shRNA (baja actividad CMA). Por último, se determinó que las células NSC-34 que expresan agregados del fragmento de 25-kDa de la porción C-terminal de TDP-43 (observada en pacientes con ALS) poseían niveles aumentados respecto del control de la enzima GAPDH y de NF-H, sugiriendo una inhibición de la CMA en esta línea celular. Además, comparada con el control, esta línea celular formó prolongaciones más largas a tiempos más cortos del proceso de diferenciación, las cuales luego se redujeron. Esta reducción coincidió con la observación de cúmulos o agregados de NF-H. Esto último está apoyado por resultados recientemente publicados por nuestro laboratorio los cuales demuestran que un modelo de agregación de TDP-43 desarrollado en células HEK-293 posee alteraciones en la actividad de CMA. Por lo tanto, lo anterior sugiere que la línea NSC-34-TDP-25 posee una alteración en la actividad de CMA que impactaría en la conformación de la subunidad de neurofilamento NF-H y la formación axonal. De esta manera concluimos que la autofagia mediada por chaperonas tiene una función en el control del crecimiento axonal de las motoneuronas NSC-34 en condiciones fisiológicas, probablemente a través de la regulación proteica de subunidades de neurofilamento como el NF-H. Además, agregados de TDP-43 similares a los encontrados en pacientes con ALS inhibirían la actividad de la CMA, aumentando los niveles proteicos de NF-H y alterando parámetros fisiológicos de crecimiento axonal.

## SUMMARY

### **"Characterization of chaperone-mediated autophagy (CMA) in the control of axonal growth of motor neurons NSC-34 under physiological conditions and aggregation of the TDP-43 protein"**

Chaperone mediated autophagy (CMA) is a lysosomal pathway of protein degradation that, on occasions, can present an imbalance in its activity and cause an incorrect protein homeostasis. Multiple publications show that there could be a direct relationship between an imbalance in CMA activity and the appearance of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's, Parkinson's, or Huntington's. However, little is known about the state of CMA in other neurodegenerative diseases such as Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS), which is characterized by the degeneration of motor neurons of the cortex and spinal cord. Some studies have shown that the axonal growth of motor neurons of patients with ALS contain cytoplasmic aggregates of the protein TDP-43 (Transactivating Response Region (TAR) DNA binding Protein). The aggregation of TDP-43 in motor neurons would account for a loss of their function, which would be directly related to the appearance of neurodegenerative diseases such as ALS. On the other hand, studies in our laboratory showed that TDP-43 is a substrate for CMA and that aggregates of TDP-43 could affect the activity of this pathway. Additionally, through analyzes performed in silico, we were able to observe that proteins important for axon formation and stability, such as neurofilament subunits, could also be CMA substrates. Considering this background, we wanted to characterize the role of CMA activity in the axonal growth of the NSC-34 cell line (Mouse Motor Neuron-Like Hybrid Cell Line) and its relationship with TDP-43 aggregation.

We were able to observe that NSC-34 cells respond to CMA activation and inhibition stimuli. Furthermore, in the differentiation process, where cells extend their axons and neurites, we observe an increase in the levels of GAPDH (a classic CMA substrate), indicating an inhibition of CMA activity. Reaffirming this idea, the reduction of LAMP2A (key protein in CMA activity) by using a specific shRNA led to premature axonal growth of cells, compared to control cells. Regarding neurofilaments, it was observed that the NF-H subunit co-localized with LAMP2A-positive lysosomes in early stages of differentiation, suggesting that this neurofilament subunit could be a substrate for this protein degradation pathway during this stage. However, said co-localization was

diminished when the differentiated cells extended their neurites and axons, suggesting that NF-H would "escape" CMA degradation during axon formation. Supporting this idea, NF-H protein levels increased when cells underwent differentiation and also in cells with shRNA-reduced LAMP2A levels (low CMA activity). Finally, it was determined that NSC-34 cells expressing aggregates of the 25-kDa fragment of the C-terminal of TDP-43 (observed in patients with ALS) had increased levels of the GAPDH enzyme and NF-H compared to control, suggesting an inhibition of CMA in this cell line. In addition, compared to the control, this cell line formed greater prolongations at shorter times of the differentiation process, which were later reduced. This reduction coincided with the observation of accumulations or aggregates of NF-H. The latter is supported by results recently published by our laboratory which show that a TDP-43 aggregation model developed in HEK-293 cells has alterations in CMA activity. Therefore, the foregoing suggests that the NSC-34-TDP-25 line possesses an alteration in CMA activity that would impact the stoichiometry of the neurofilament subunit NF-H and axonal formation. In this way, we conclude that chaperone-mediated autophagy has a role in the control of axonal growth of NSC-34 motor neurons under physiological conditions, probably through the protein regulation of neurofilament subunits such as NF-H. Furthermore, aggregates of TDP-43 like those found in patients with ALS would inhibit CMA activity, increasing protein levels of NF-H and altering physiological parameters of axonal growth.

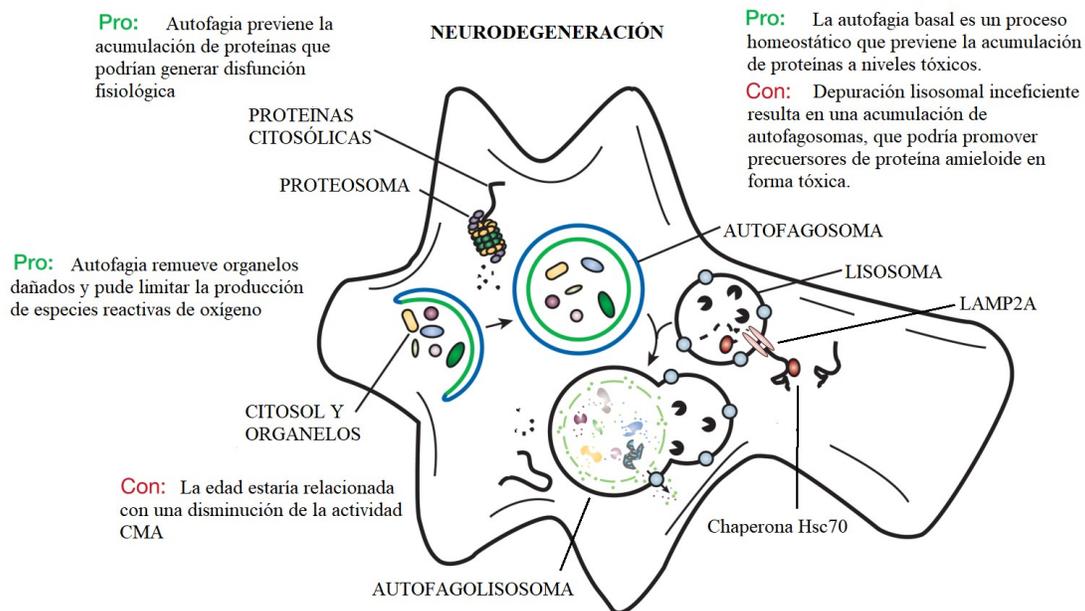


# INTRODUCCIÓN

## 1. CMA y neurodegeneración

Un adecuado balance en la actividad del proceso de autofagia es crucial para la homeostasis celular y tisular. En particular, la autofagia es necesaria para mantener el normal funcionamiento del sistema nervioso central (CNS), evitando la acumulación de proteínas mal plegadas, agregadas u oxidadas (Mizushima et al., 2009). Su disfunción ha sido directamente relacionada con un creciente número de enfermedades neurodegenerativas (Wong & Cuervo, 2010). En el caso de la CMA, se ha demostrado que un desbalance en esta vía podría estar relacionada con la aparición o progresión de patologías como enfermedad de Huntington (HD), enfermedad de Parkinson (PD), esclerosis lateral amiotrófica (ALS), demencia frontotemporal (FTLD), tautopatías (Mackenzie et al, 2010; Koga et al, 2011; Xilouri & Stefanis, 2015; Budini et al., 2017).

Una de las características de las patologías neurodegenerativas anteriormente nombradas, es que podrían desencadenarse o ser potenciadas por una falla en el sistema de degradación de proteínas. En este sentido, un mal manejo de proteínas aberrantes altera la correcta proteostasis y a menudo conduce a la acumulación de agregados proteicos que contribuyen a la muerte neuronal (Wong & Cuervo, 2010) (**Figura 1**).



**Figura 1. Neurodegeneración.** La autofagia parece desarrollar un efecto protector contra la neurodegeneración, sin embargo, no se ha comprendido completamente cómo la autofagia podría prevenir la neurodegeneración. Pro: promueve; Con: consecuencia. Extraído y modificado de (Wong y Cuervo., 2010).

## 2. Enfermedades Neurodegenerativas (ND)

### 2.1 Características de las enfermedades neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por una disminución en el número de células de determinadas poblaciones neuronales. Lo anterior, provoca desórdenes neurodegenerativos que pueden ser clasificados por un amplio espectro de características clínicas (Kovacs, 2017), como alteración en los procesos de memoria y lenguaje, modificación en el control y coordinación del movimiento o debilidad progresiva (Segura & Galindo, 2003). Por ejemplo, en la enfermedad de Alzheimer (AD) se ha observado una depleción de neuronas colinérgicas fundamentalmente en el hipocampo y la amígdala (Lane, Hardy, & Schott, 2018), en la enfermedad de Parkinson (PD) son neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra y ganglios basales las afectadas (Lane et al., 2018), mientras que en Esclerosis Lateral Amiotrófica (ALS) se reduce la población selectiva de motoneuronas en el cerebro y la médula espinal (Andersen & Al-Chalabi, 2011). La mayoría, pero no todas las enfermedades neurodegenerativas están caracterizadas por depósitos proteicos y comparten muchos procesos asociados con anomalías en los sistemas ubiquitina-proteosoma, en el sistema autofágico-lisosomal, estrés oxidativo, apoptosis, excitotoxicidad e inflamación (Kovacs, 2017) (**Tabla 1**)

**Tabla 1. Procesos en común asociados a enfermedades neurodegenerativas.**

Enfermedad	Apoptosis	Excitotoxicidad	Estrés Oxidativo	Agregación proteínas	inflamación
Alzheimer	+	+	+	+	+
Parkinson	+	+	+	+	+
Huntinton	+	+	+	+	
Esclerosis Lateral Amiotrófica	+	+	+	+	

Algunas enfermedades neurodegenerativas son clasificadas según el tipo de proteína que la provoca (**Tabla 2**). Por ejemplo las enfermedades amiloides son provocadas por fibras proteicas insolubles que tienen características estructurales específicas que incluyen una rica estructura secundaria de hoja  $\beta$ -plegada (Dugger & Dickson, 2017). Las Tautopatías son desordenes asociados con acumulaciones patológicas de proteína Tau en neuronas y glía. Tau es una fosfoproteína asociada a microtúbulo, es abundante en axones y está involucrada en promover la polimerización y estabilización de los microtúbulos (Lebouvier, Pasquier, & Bue, 2017). Las sinucleinopatías son una clase de enfermedad neurodegenerativa que se caracteriza por agregación de proteína presináptica  $\alpha$ -sinucleína

dentro de las neuronas y glía, principalmente en oligodendroglía. Se ha determinado que está involucrada en el tráfico vesicular sináptico (Ottolini et al., 2016).

**Tabla 2. Enfermedades neurodegenerativas más comunes.**

Enfermedad	Neuropatología	Agregado proteico	Vulnerabilidad anatómica
<b>Amiloidosis</b>			
• Alzheimer	Ovillos neurofibrilares (NFT) Placa Neurítica y amiloide Angiopatia amilodes	A $\beta$ 3R + 4R tau	Prosencéfalo basal Lóbulo frontal y temporal Bulbo Olfatorio Estructura límbica
<b>Tautopatías</b>			
• Encefalopatía traumática crónica	Ovillos astrocíticos tau Ovillos neurofibrilares (NFT) Hilos de neurópilo	3R + 4R tau	Lóbulo frontal, temporal y parietal
<b><math>\alpha</math> – sinucleinopatía</b>			
• Atrofia sistémica múltiple	Inclusiones citoplasmáticas gliales	$\alpha$ -sinucleína	Putamen, sustancia nigra, Cerebelo, núcleos pontinos, médula (núcleo olfatorio inferior)
<b>Proteinopatía TDP-43</b>			
• Degeneración frontotemporal lobar	Inclusiones neuronales citoplasmáticas y nucleares Neuritas distróficas	TDP-43	Corteza frontal y temporal Ganglios basales Sustancia nigra
• Esclerosis Lateral Amiotrófica	Perdida de motoneuronas Superiores e inferiores Inclusiones neuronales	TDP-43	Corteza motora Motoneuronas de espina dorsal y cerebrales
• Esclerosis Lateral Primaria	Perdida de motoneuronas Superiores Degeneración tracto Cortico espinal	TDP-43	Corteza motora tracto cortico espinal

A  
|  
g  
u  
n  
a  
s

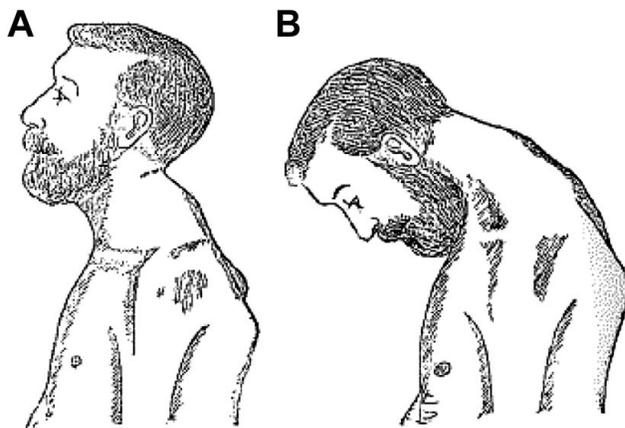
de las enfermedades neurodegenerativas son las llamadas Amieloides, Tautopatías,  $\alpha$ -Sinucleinopatías, y Proteinopatías. TDP-43 (Proteína 43 de unión a DNA de respuesta transactivante); A $\beta$  Proteína de estructura secundaria hoja alfa-beta plegada; (3R + 4R tau) corresponde al splicing alternativo del exon 10 de la proteína Tau la cual genera 3 isoformas con 4 repeticiones conservadas de 32 aminoácidos y 3 isoformas con 3 repeticiones conservadas de 32 aminoácidos en un dominio crítico de unión a microtúbulo.

Existen otros tipos de proteinopatías asociadas a la proteína TDP-43 y fueron descubiertas por ser ésta, la principal componente de inclusiones neuronales en la Esclerosis Lateral Amiotrófica (Neumann et al., 2006; Hu et al., 2008). TDP-43 normalmente es una proteína nuclear, pero en enfermedades neurodegenerativas forma cuerpos de inclusión ubiquitinados y fosforilados (agregados) en el citoplasma y núcleo. (Mackenzie et al., 2010; Tripathi et al., 2014).

### 3. Esclerosis Lateral Amiotrófica (ALS)

#### 3.1. Características de la enfermedad

ALS es una enfermedad neurodegenerativa de curso progresivo que afecta a las motoneuronas de la asta anterior y a la vía corticoespinal que se manifiesta principalmente con debilidad muscular, amiotrofia e hiperreflexia. Jean-Martin Charcot (1825 – 1893) fue el primero en describir la enfermedad en 1869. Relacionaba el síndrome clínico de parálisis y atrofia muscular progresiva con la pérdida neuronal en los núcleos motores y la lesión de los fascículos anterolaterales (esclerosis lateral) de la médula. Charcot publicó dos casos de atrofia muscular progresiva en que los labios, lengua y extremidades estaban involucradas. En cada uno de los casos, después de la muerte, descubrió atrofia de las raíces espinales anteriores y de los nervios hipogloso, además de atrofia de la columna lateral y desgaste extremo de las células ganglionares y de la *cornu anterius* (Esquerda Joseph E, 2005; Andersen, P. M., & Al-Chalabi, A. 2011; Katz, Dimachkie, & Barohn, 2015) (**Figura 2**). El término amiotrofia se refiere a la atrofia muscular que se produce cuando los músculos están crónicamente inactivos al dejar de recibir señales nerviosas (Esquerda, 2005). En relación con estos cambios patológicos, Charcot denominó a la enfermedad Esclerosis Lateral Amiotrófica (ALS).



**Figura 2. Atrofia muscular progresiva, debilidad de músculos del cuello. (A)** postura habitual de la cabeza, inclinada hacia atrás. **(B)** Posición en que cae la cabeza si el paciente intenta mantener el equilibrio. Extraído de (Katz et al., 2015).

### 3.2. Características epidemiológicas

La mayoría de los casos de ALS se presentan de forma esporádica, no obstante, una pequeña proporción son casos familiares (hereditarios). En casos de ALS esporádica, la proporción de hombres frente a mujeres afectadas es 2:1, dato que se asemeja a la distribución de la enfermedad por sexo en la población chilena (**Tabla 3**), mientras que en ALS familiar la proporción es 1:1 (Brown & Al-Chalabi, 2017).

**Tabla 3.**

**Distribución según sexo**

Hombres 64 %  
Mujeres 34 %

**Distribución de la enfermedad en la población chilena según género.** (MINSAL 2017).

La incidencia de ALS es bastante uniforme en la mayoría de los países, con una prevalencia de 4-6 casos por cada 100.000 habitantes. (Chió, 2005). En Chile la incidencia de ALS se ha estimado en un promedio de 1 por cada 50.000 habitantes. (**Tabla 4**).

**Tabla 4.**

**Pacientes con ALS en Chile**

Región	Casos	% distrib
I	6	1,8 %
II	8	2,4 %
III	4	1,2 %
IV	3	0,9 %
V	30	9,1 %
VI	21	6,3 %
VII	22	7 %
VIII	23	7 %
IX	9	3 %
X	7	2 %
XI	1	0 %
XII	4	1 %
RM	183	55 %
XIV	10	3 %
TOTAL	331	

**Población nacional diagnosticada con ALS.**

Población que se encuentra bajo control hospitalario, lo que equivale a casi el 100 % de los usuarios a nivel país. MINSAL 2017.

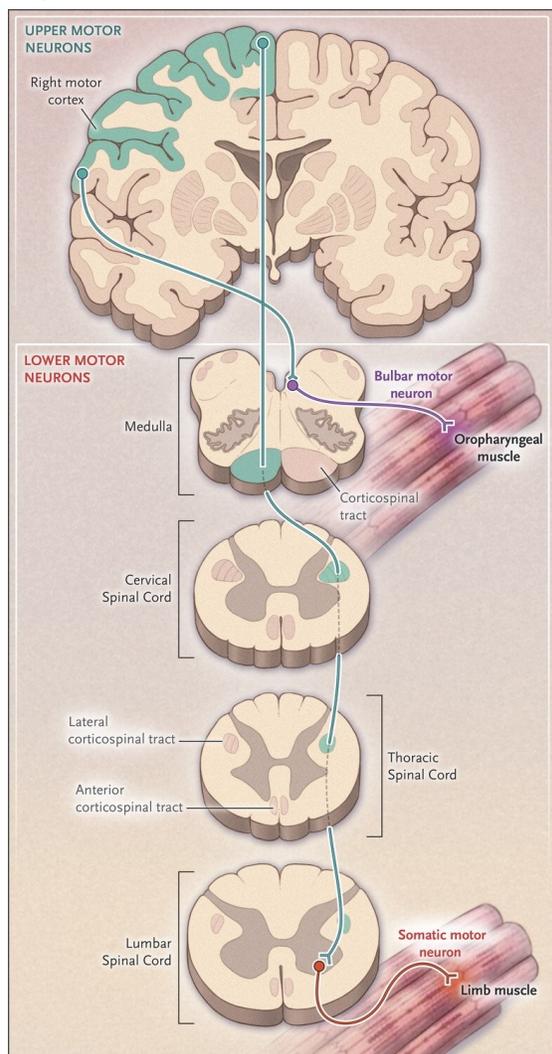
ALS esporádica debería referirse estrictamente a la enfermedad que se presenta sin una historia familiar de ALS. La secuenciación de DNA en personas con ALS esporádica han revelado que las variantes genéticas de ALS no son infrecuentes. Por ejemplo, hoy se sabe que entre 1 % y 3 % de los casos de ALS esporádica son causados por una mutación sin sentido en el gen SOD1 y que otro 5 % o más son causados por expansiones intrónicas en C9orf72 (Taylor et al., 2016). La única característica clínica que distingue la ALS familiar de la esporádica es que la familiar posee una menor edad media de inicio (10 años más temprana aproximadamente) (Lillo et al., 2014). El impacto

presupuestario estimado para el año 2018 fue de MM\$ 1.524 de pesos. (Según informe de

evaluación científica basada en evidencia disponible. Esclerosis Lateral Amiotrófica. Santiago, MINSAL 2017).

### 3.3. Características patológicas

**Figura 3. El sistema motor.**



El sistema motor está compuesto de motoneuronas corticoespinales en la corteza (Superiores) y neuronas motoras bulbares y espinales (inferiores), que inervan el músculo esquelético. Extraído de (Brown & Al-Chalabi, 2017). Las motoneuronas están agrupadas en poblaciones superiores en la corteza motora y poblaciones inferiores en el tronco cerebral y médula espinal; las motoneuronas inferiores inervan los músculos.

La expresión esclerosis lateral amiotrófica se caracteriza por una pérdida progresiva de motoneuronas inferiores (IMN) en el tronco cerebral y médula espinal, además de pérdida de motoneuronas superiores (SMN) de la lámina VI de la corteza cerebral (Lillo et al., 2014). La degeneración de la vía piramidal interrumpe las conexiones entre la primera motoneurona de la corteza cerebral y la segunda motoneurona situada en la asta anterior de la médula espinal (**Figura 3**). Lo anterior conduce a la pérdida de los controles inhibitorios ejercidos por la primera

motoneurona sobre la segunda; sin este freno se produce una exaltación de los reflejos tendinosos de la espasticidad propias de ALS. Cuando las motoneuronas inferiores comienzan a ser afectadas muestran una excitabilidad eléctrica excesiva lo que lleva a contracciones musculares espontáneas (fasciculaciones) (Vucic et al., 2014). A medida que van degenerando pierden conectividad sináptica con los músculos, que luego se atrofian (Brown & Al-Chalabi, 2017). La debilidad generalizada, la atrofia muscular y las parálisis inherentes a la enfermedad reflejan el daño sufrido por la segunda motoneurona (Esquerda,

2005). El hallazgo patológico más ampliamente investigado en ALS ha sido la acumulación de agregados proteicos y los defectos correspondientes en las vías celulares para la degradación de las proteínas (Brown & Al-Chalabi, 2017).

### 3.4. Características genéticas

La primera mutación genética encontrada que causa ALS fue reportada en 1993 e involucró al gen SOD1 (Beckman et al., 1993). En la actualidad más de 50 potenciales genes asociados a la enfermedad han sido identificados desde entonces (Taylor et al., 2016). Los casos de ALS familiar se han atribuido a mutaciones en 12 genes diferentes, siendo los más comunes SOD1, FUS, C9orf72 y TARDBP (TDP-43) (Brown & Al-Chalabi, 2017). Los genes identificados explican el 25–35 % de los casos de ALS familiar (Andersen & Al-Chalabi, 2011). Estos genes pueden ser agrupados en varias categorías: genes que alteran la proteostasis, genes que perturban la estabilidad, función y metabolismo del RNA y genes que perturban la dinámica del citoesqueleto en el axón y la porción distal de las motoneuronas (Taylor et al., 2016). (**Tabla 5**)

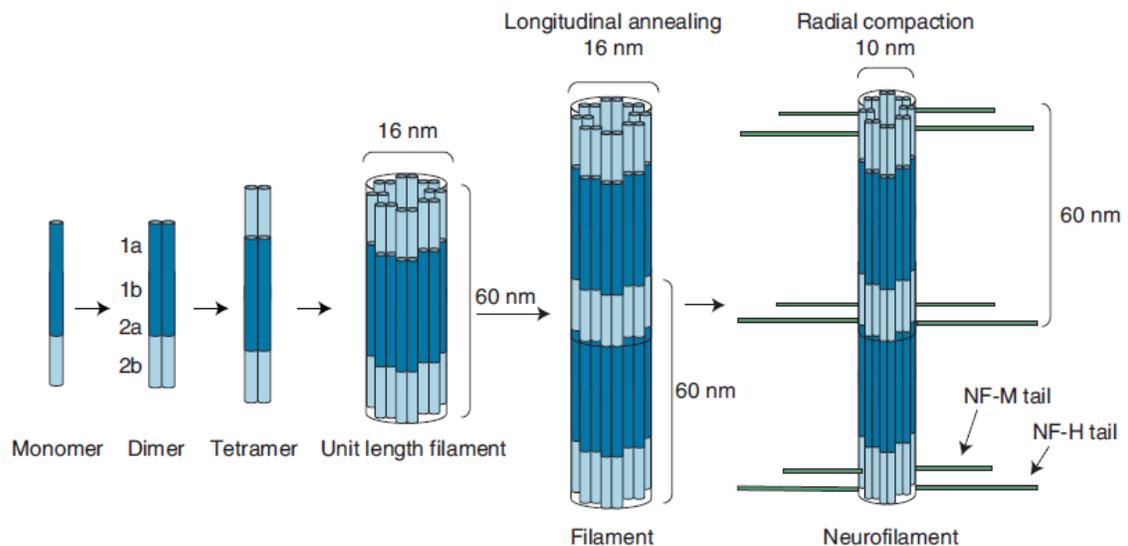
**Tabla 5. Principales genes que provocan ALS.**

Gen	Proteína	Función	Mutación	Proporción ALS		Descubrimiento
				Familiar	Esporádica	
SOD1	Superóxido dismutasa	Superóxido Dismutasa Cu-Zn	> 150	20%	2%	1993
TARDBP	TDP-43	Proteína de unión a DNA	> 40	5%	1%	2008
FUS	FUS	Proteína de unión a DNA	> 40	5%	1%	2009
OPTN	Optineurina	Adaptador de Autofagia	1	4%	1%	2010
C9orf72	C9orf72	Posible factor de intercambio de nucleótidos de guanina	repetición intrón GGGGCC	25%	10%	2011
UBQLN2	Ubiquitin 2	Adaptador de Autofagia	5	< 1%	< 1%	2011
SQSTM1	Secuestrosoma 1	Adaptador de Autofagia	10	< 1%	?	2011
TBK1	TBK1 serina/Treonina proteína kinasa	Regulador de Autofagia e inflamación	10	?	?	2015

Se ha encontrado que cada uno de estos genes está mutado en más de una familia afectada por ALS. Ha resultado casi imposible predecir la relevancia de una variante para ALS a partir de las características biológicas del mismo gen. Adaptado de (Taylor et al., 2016).

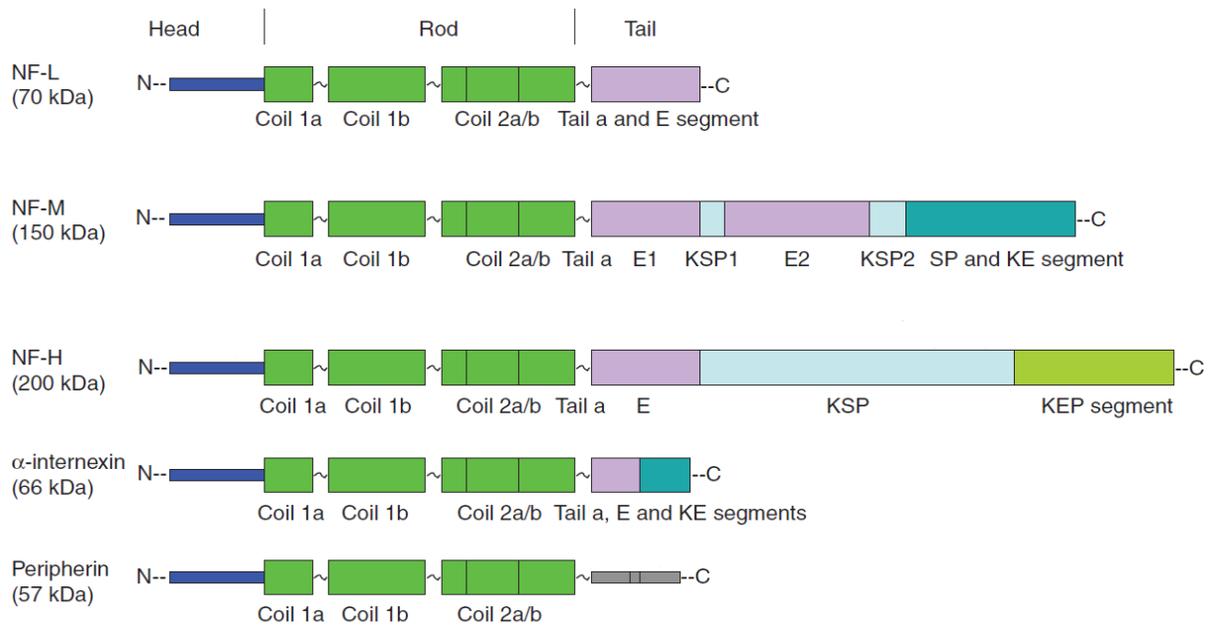
### 3.5. ALS y neurofilamentos

Las motoneuronas deben su aspecto dendriforme a la disposición y la mantención de una correcta homeostasis de su citoesqueleto lo que le da estabilidad al axón y permite una correcta señalización a través de éste (Oberstadt et al., 2018). En el sistema nervioso central, el citoesqueleto está formado por neurofilamentos (NFs) (**Figura 4**) que se componen de las siguientes 4 unidades: polipéptidos livianos (NF-L), mediano (NF-M), pesado (NF-H) y alfa-internexina. Esta última es reemplazada por periferina en el sistema nervioso periférico (Yuan et al., 2017) (**Figura 5**). Se ha encontrado que la estequiometría de cada subunidad de neurofilamento debe estar finamente regulada para permitir la correcta función del axón (Williamson et al., 1998).



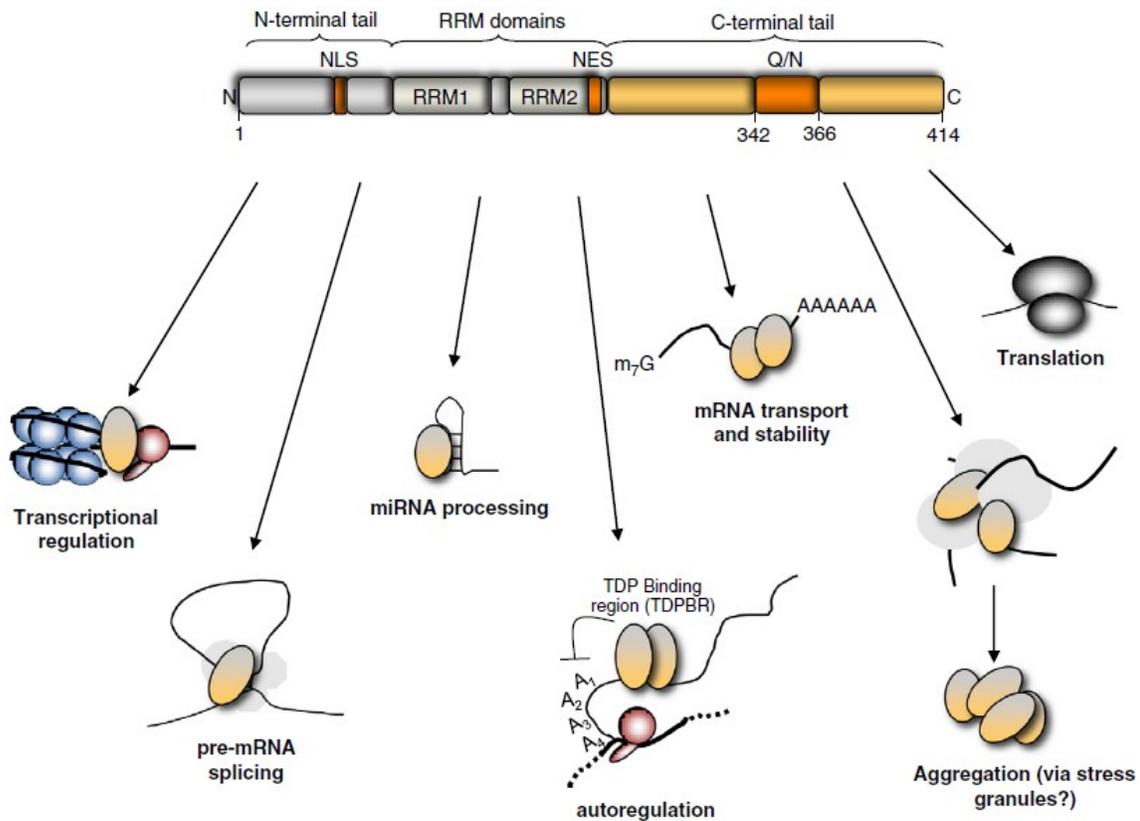
**Figura 4. Ensamblaje del neurofilamento.** Diferentes monómeros de NFs forman heterodímeros paralelos de espirales enroscados entre subunidades de dominios centrales. Dos dímeros forman tetrámeros antiparalelos escalonados a través de interacciones entre los dominios 1a, 1b y 2a. La asociación lateral de 8 tetrámeros resulta en la formación de una estructura cilíndrica conocida como filamentos de longitud unitaria (ULF). Con un diámetro aproximado de 16 nm y una longitud de 60 nm. La alineación término-término de estas ULF en dirección longitudinal resultan en la elongación del neurofilamento, que es seguida de una compactación radial, para finalmente lograr un polímero largo y maduro de neurofilamento de un diámetro de 10 nm. Extraído de (Yuan et al., 2017).

En pacientes con ALS, se ha observado una disminución en la expresión de la cadena ligera de neurofilamento (NF-L) (Dalgleish et al., 1994) y se ha descrito que el RNA mensajero de NF-L tiende a quedar reclutado en los gránulos de estrés de las motoneuronas de pacientes con ALS (Volkening et al, 2009). Adicionalmente, se ha encontrado que los niveles proteicos de NF-L y pNF-H (una forma fosforilada de NF-H) incrementan entre 5 a 10 veces en el líquido cefalorraquídeo (CSF) y suero en pacientes con ALS, comparados con individuos sanos (Brettschneider et al., 2006). También, se ha observado que un aumento a nivel de proteína de neurofilamentos y periferina estaría asociado a la conformación de grandes “inflamaciones” axonales de motoneuronas (Corbo & Hays., 1992). En su conjunto estos datos indican que los niveles proteicos de los neurofilamentos estarían alterados en pacientes de ALS, lo que probablemente podría perturbar la viabilidad neuronal.



#### 4. ALS y TDP-43

Como se mencionó anteriormente, una de las principales proteínas que se alteran en la ALS es TDP-43 la cual es ubicua y está compuesta de 414 aminoácidos con una masa molecular de 43 kDa. La proteína está codificada por el gen TARDBP que se encuentra en el cromosoma humano número 1p36 y contiene 5 exones codificantes y uno no codificante (Ou et al., 1995; Van Eersel et al., 2011; Afroz et al., 2017). La misma se localiza predominantemente en el núcleo celular donde su interacción principal es con moléculas de RNA. Diferentes estudios han demostrado que las funciones biológicas de TDP-43 están relacionadas con la represión transcripcional, splicing de pre-RNAs, traducción de mRNA, transporte de RNA, síntesis de miRNA, regulación del ciclo celular, apoptosis (Buratti, 2008), transporte y estabilidad (Claudia Colombrita, 2012; Lee et al., 2012) (**Figura 6**).



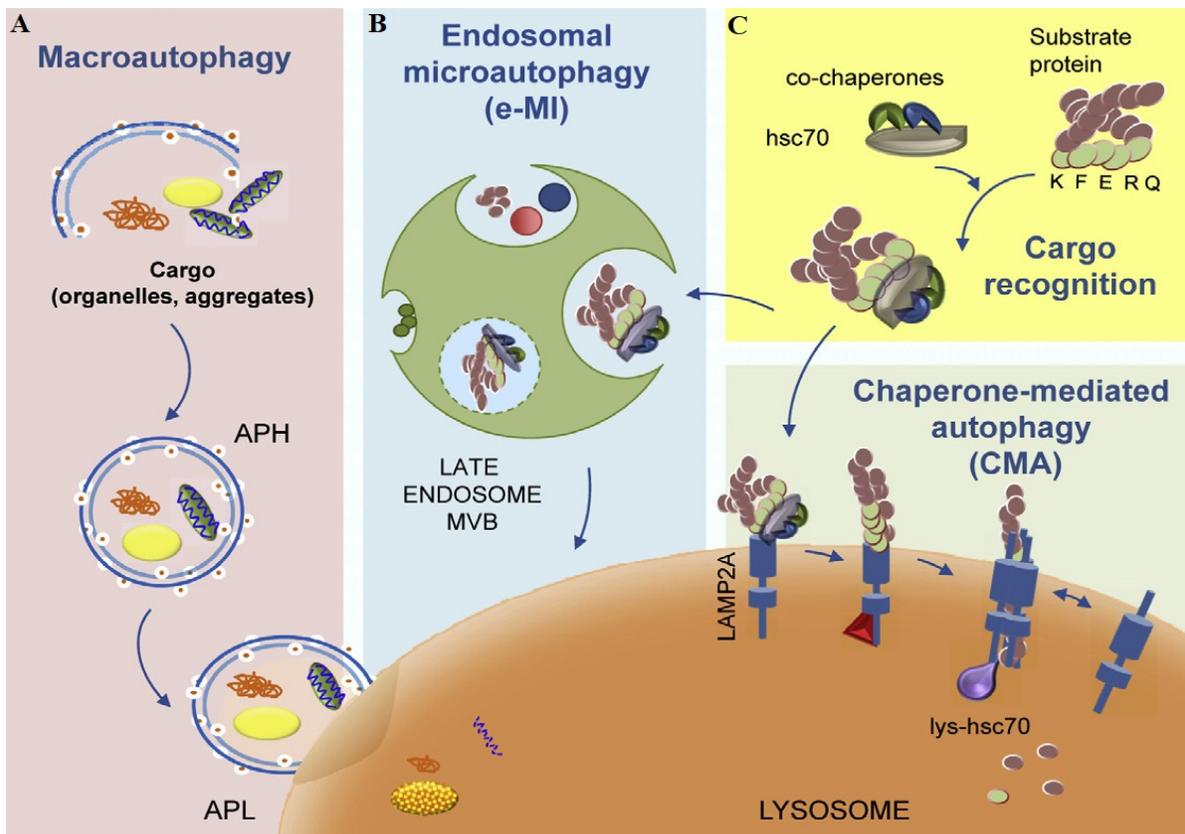
**Figura 6. Representación esquemática de la estructura y funciones celulares reguladas por TDP-43.** La proteína se divide en dominio N- y C- terminal y contiene dos dominios funcionales de unión a RNA (RRM1 y RRM2). Dentro del extremo N-terminal se ubica la secuencia de localización nuclear (NLS). Dentro del RRM2 se encuentra la secuencia de exportación nuclear (NES). Además, la región Q/N es rica en aminoácidos asparagina y glutamina presente en el extremo C-terminal. Extraída de (Budini et al., 2012).

En ALS, TDP-43 se ha encontrado agregada en el citoplasma, y con menor frecuencia, en el núcleo de las células afectadas. Tales agregados están compuestos por la proteína completa, pero además por productos de clivaje de 25-kDa y 35-kDa correspondientes al C-terminal de la proteína. Además, se ha observado que los agregados se encuentran fosforilados y ubiquitinados (Afroz et al., 2017; Neumann et al., 2006). Se ha propuesto que los agregados de TDP-43 podrían actuar como “sumidero” para la proteína TDP-43 funcional recientemente sintetizada (Budini et al., 2012), lo que llevaría a la pérdida de función de TDP-43 en la célula. Por lo tanto, la pérdida de función de TDP-43 o sus agregados podrían provocar la muerte celular de neuronas y, por lo tanto, la neurodegeneración (Budini, Baralle, & Buratti, 2014; Budini et al., 2015; Neumann et al., 2006; Tripathi et al., 2014; Mackenzie et al., 2010).

## **5. Autofagia: Vía de eliminación y control proteico**

### **5.1. Autofagia**

La autofagia es un proceso intracelular autodegradativo altamente conservado en todos los eucariotas, en donde diversos componentes celulares como proteínas y organelos son degradados por los lisosomas (Patel & Cuervo, 2015). En mamíferos, al igual que en muchas otras especies, la autofagia se manifiesta principalmente en respuesta a la ausencia de nutrientes (Mizushima, 2004). Además, dependiendo del mecanismo por el cual el material intracelular (carga) es degradado por los lisosomas, puede ser dividida en: Macroautofagia **(A)**, Microautofagia **(B)** y autofagia mediada por chaperonas (CMA por sus siglas en inglés chaperone mediated autophagy) **(C) (Figura 7)**



**Figura 7. Tipos de autofagia en mamíferos.** Esquemas básicos de los tres diferentes tipos de autofagia. **(A)** Macroautofagia: Inicio de la Macroautofagia muestra la formación de fagoforo, que comprende secuestro inicial de organelos y agregados. Posteriormente se expande y fusiona la membrana dando origen a un autofagosoma (AFH) el cual se fusiona con un lisosoma dando origen a un autofagolisosoma (APL) donde se degrada el contenido (carga) completando el proceso. **(B)** Microautofagia: Ocurre por medio de invaginación lisosomal o por fusión endosomal, donde el contenido citosólico es entregado mediante vesículas o por la interacción entre la chaperona HSC70 la cual atrapa e internaliza el cargo en los lisosomas. **(C)** autofagia mediada por chaperonas (CMA) las proteínas sustrato son reconocidas por la chaperona HSC70, transportadas al lisosoma y translocadas a través de la membrana lisosomal asistida por el receptor de membrana LAMP2A y una chaperona luminal para así poder degradar el cargo por hidrolasas lisosomales. Extraído de (Patel & Cuervo, 2015).

## 5.2. Macroautofagia

La macroautofagia (**Figura 7A**) es la forma de autofagia más estudiada. Se caracteriza por la formación de una doble capa lipídica estructural llamada “omegasoma”, que nace a partir de dominios membranosos intracelulares y se expande hasta formar un

organelo llamado autofagosoma, el cual secuestra el cargo que va a ser degradado. Luego, el autofagosoma se fusiona con lisosomas que son los que suplen de enzimas e hidrolasas. La fusión entre autofagosoma y el lisosoma dan origen a otra estructura denominada autofagolisosoma que es el organelo que promueve la degradación del cargo. La degradación del cargo, especialmente proteínas, genera nuevos metabolitos que regresan al medio citosólico y pueden ser reutilizados por la célula (Tooze & Dikic, 2016).

#### **4.3. Microautofagia**

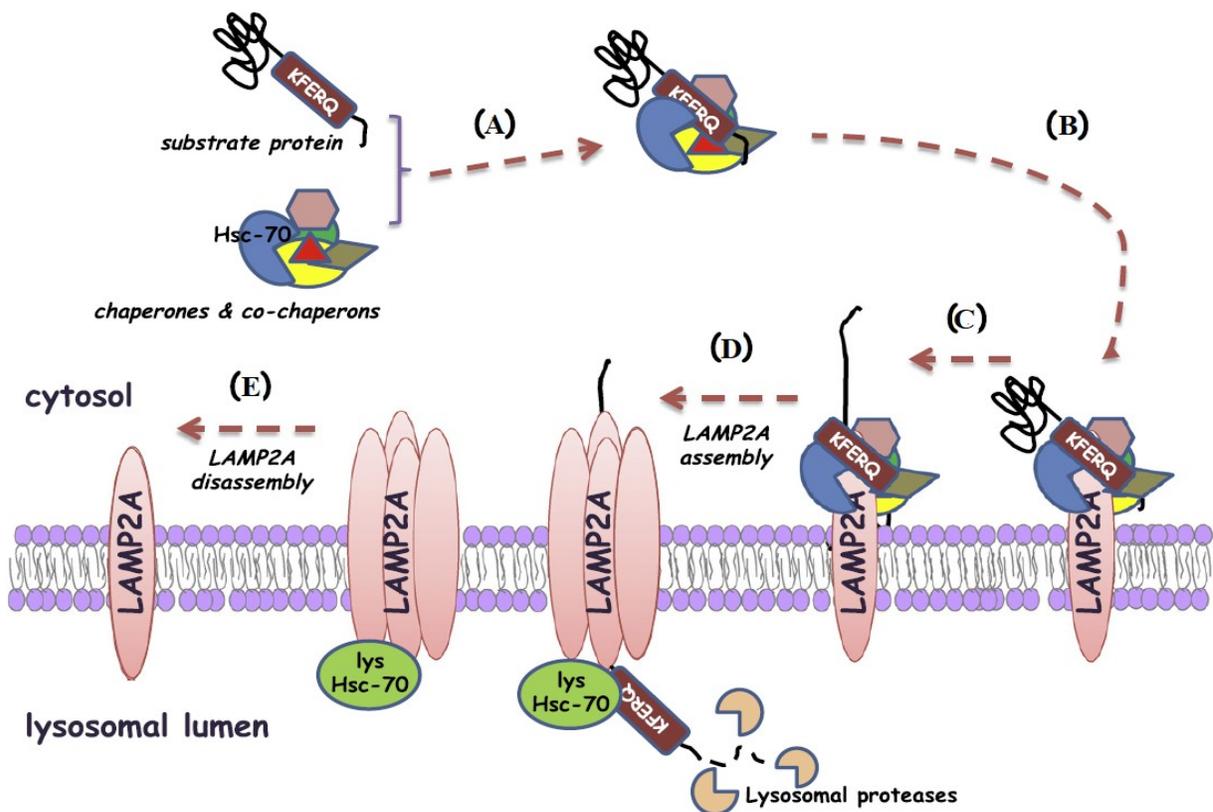
La microautofagia (**figura 7B**) se caracteriza por el comportamiento dinámico que presenta la membrana lisosomal la cual se invagina, envolviendo y transportando directamente los componentes citosólicos al interior del lumen del lisosoma. Se han descrito 3 tipos de microautofagia. Tipo 1, microautofagia con protrusión lisosomal; Tipo 2, microautofagia con invaginación lisosomal y tipo 3, microautofagia con invaginación endosomal (Oku & Sakai, 2018).

#### **4.4. Autofagia mediada por chaperonas (CMA)**

La CMA (**Figura 7C**) tiene como característica distintiva que solo ha sido descrita en mamíferos, donde cuya componente limitante es la proteína de membrana tipo 2 asociada a lisosomas (LAMP2A) (Patel & Cuervo, 2015). Además solo degrada proteínas y no organelos (Cuervo & Dice, 1998). Las proteínas que serán degradadas por esta vía autofágica son seleccionadas a través del reconocimiento de un motivo en su secuencia aminoacídica (Dice, 1990). Dicho motivo, corresponde a los aminoácidos KFERQ, el cual es reconocido por la proteína chaperona HSC70 (Wang & Mao, 2015; Dice, 1990). El reconocimiento del dominio KFERQ permite la remoción de proteínas específicas, haciendo a la CMA un eficiente sistema de degradación de proteínas anómalas o dañadas (Cuervo & Wong, 2014). La unión de este motivo a HSC70 es necesaria para el transporte de la proteína blanco hacia el lisosoma (Chiang et al, 1989). La recepción lisosomal de estas proteínas requiere de unión a la proteína LAMP2A la cual es denominada receptor de CMA y está asociada a la membrana

lisosomal. Las proteínas sustrato son desplegadas y translocadas dentro del lumen lisosomal a través de la membrana con la asistencia de una chaperona luminal (Lys-HSC70) (Bandyopadhyay et al, 2008) (**Figura 8**).

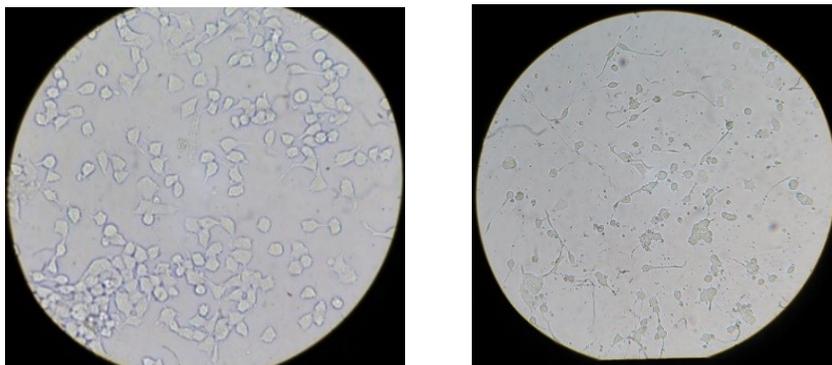
Todas las células poseen una actividad basal de CMA, sin embargo, el proceso puede ser activado bajo distintas condiciones tales como, estrés oxidativo, privación de nutrientes, o exposición a compuestos tóxicos, entre otros. Una activación de la CMA puede ser evidenciada por un aumento en los niveles totales de LAMP2A y/o HSC70 o por una relocalización de lisosomas positivos para LAMP2A en el perinúcleo celular (Cuervo & Dice, 2000; Cuervo, 2004; Kaushik & Cuervo, 2009).



**Figura 8. Representación esquemática de los principales procesos de autofagia mediada por chaperonas (CMA).** (A) La proteína sustrato portadora del motivo de reconocimiento KFERQ es reconocida en el citosol por el sistema co-chaperonas y chaperona HSC70. (B) El complejo transporta la proteína a la superficie de la membrana lisosomal, donde se une a la base citosólica de la proteína LAMP2A. (C) La unión permite el despliegue de la proteína sustrato. (D) La unión de la proteína sustrato permite la multimerización de LAMP2A y con la ayuda de la proteína lisosomal Lys-HSC70 se promueve la traslocación de la proteína sustrato a través de la membrana lisosomal y la subsecuente degradación de la proteína cargo por proteasas lisosomales. (E) La proteína Lys-HSC70 permite el desensamblaje del complejo LAMP2A, quedando estas proteínas LAMP2A disponibles para unir otras proteínas sustrato. (Extraído de Xilouri & Stefanis., 2015).

## 6. NSC-34 como modelo de estudio de ALS

Las células NSC-34 son una línea neuronal híbrida, derivada de la fusión de motoneuronas enriquecidas en células embrionarias de médula espinal de ratón con neuroblastoma (Sabitha et al., 2016). En nuestro laboratorio caracterizamos el comportamiento de esta línea celular, lo que involucró poner previamente en marcha las condiciones de cultivo que han sido documentadas por otros investigadores antes de realizar nuestros ensayos propuestos. La **Figura 9A** muestra la distribución de las células cuando éstas son cultivadas en placas p100 a partir de una concentración de 500 mil cels/cm<sup>2</sup>.



**Figura 9A. y 9B Células NSC-34 en 10 % (v/v) y 0,5 % de FBS.** Las células que se muestran en la figura han sido mantenidas en medio SIGMA suplementado con 10 % (v/v) y 0,5 % (v/v) de FBS. Las imágenes representativas fueron hechas con un microscopio óptico Leica DM500 con un zoom óptico de 40X. Las imágenes muestran la distribución homogénea de células a la cual pueden crecer las células al sexto día de cultivo en las condiciones anteriormente descritas.

Las células NSC-34 generalmente tienen una morfología redondeada en medio de cultivo suplementado con 10 % (v/v) de FBS. En la **Figura 9B** se puede observar que cuando el cultivo alcanza un 50 % de confluencia, las células comienzan a formar las primeras prolongaciones neuríticas, mientras que otras se mantienen redondeadas (no diferenciadas). Estas células pueden diferenciarse en medio de cultivo suplementado con baja concentración de suero, lo que permite que se extiendan las neuritas y axones.

Estas extensiones neuríticas son un marcador morfológico de maduración neuronal, que permite emplear a las células NSC-34 como un modelo experimental. En el presente estudio, utilizando este modelo similar de motoneuronas, nosotros intentamos elucidar la función de

la CMA en el desarrollo de prolongaciones como neurita y axón en condiciones fisiológicas y en condiciones de agregación de la proteína TDP-43.

## 7. Tema de estudio de la tesis:

La degradación lisosomal ha sido ampliamente estudiada, y da cuenta de ello los más de 7 mil estudios publicados al respecto en donde se ha evidenciado la existencia de degradación selectiva y no selectiva por parte de los lisosomas. Por el contrario, estudios que relacionan autofagia y neurodegeneración son un poco más reducidos. Variadas investigaciones al respecto utilizan la línea celular NSC-34 para llevar a cabo estudios que relacionan macroautofagia y neurodegeneración, pero no existe investigación que desarrolle el comportamiento de la CMA en la línea celular NSC-34 y la relación que existiría con la neurodegeneración en esta línea de motoneuronas la cual es utilizada para investigaciones relacionadas con ALS. Por lo anterior, en la presente memoria hemos propuesto iniciar un estudio de caracterización de la línea celular NSC-34 en cuanto a cómo se comporta frente a cambios en la actividad de la CMA y, además, realizar una aproximación de cómo la actividad CMA varía durante la diferenciación de estas células a motoneuronas. Es importante señalar que durante esta investigación también evidenciamos la existencia de cuatro sitios de reconocimiento tipo KFERQ en la secuencia aminoacídica de la cadena pesada de neurofilamento (NF-H) humano y tres en la secuencia aminoacídica NF-H de ratón (**Tabla 6**). Esto nos hizo suponer la posibilidad de que esta proteína podría ser sustrato de la CMA. Frente a esta idea, y siendo las subunidades de neurofilamentos necesarias para la correcta formación del axón, también nos propusimos responder cómo varían los niveles proteicos de NF-H en condiciones de baja actividad CMA y si esto tiene una relación con un rol de la CMA durante el crecimiento axonal. Finalmente, estudios realizados en nuestro laboratorio en un modelo celular de agregación de TDP-43 (Budini et al., 2015), demostraron que la agregación de TDP-43 impacta en la actividad de la CMA (Ormeño et al., 2020). Por esta razón, en esta memoria también incluimos un modelo de agregación de TDP-43 de NSC-34 para estudiar la relación entre la actividad de la CMA, niveles proteicos de NF-H y desarrollo de neuritas.

**Tabla 6. Secuencias homólogas a KFERQ.**

NF-H_HUMAN	MMSFGGADALLGAPFAPLHGGGSLHYALARKGAGGTRSAAAGSSSGPHSWTRTSVSSVSA	60
NF-H_MOUSE	MMSFGSADALLGAPFAPLHGGGSLHYSLSRKAAGPGGTRSAAAGSSSGPHSWARTSVSSVSA	60
NF-H_HUMAN	SPSRFRGAGAASSTDSLDTLSNGPEGCMVAVATSRSEKEQLQALNDRFAGYIDKVRQLEA	120
NF-H_MOUSE	SPSRFRGA--ASSTDSLDTLSNGPEGCVVAVAARSEKEQLQALNDRFAGYIDKVRQLEA	118
NF-H_HUMAN	HNRSLGEAAALRQQQAGRSAMGELYEREVREMRGAVLRLGAARGQLRLEQEHLLEDIAH	180
NF-H_MOUSE	HNRSLGEAAALRQQQAGRAAMGELYEREVREMRGAVLRLGAARGQLRLEQEHLLEDIAH	178
NF-H_HUMAN	VRQRLDEEARQREEEAAARALARFAQEAEARVLDLQKKAQALQECCGYLRRHHQEVEGE	240
NF-H_MOUSE	VRQRLDEEARQREEEAAARALARFAQEAEARVELQKKAQALQECCGYLRRHHQEVEGE	238
NF-H_HUMAN	LLGQIQGGGAAQAQMAETRDALKCDVTSALREIRAQLEGHAVQSTLQSEEFVRLDRL	300
NF-H_MOUSE	LLGQIQCGGAAQAQAEARDALKCDVTSALREIRAQLEGHAVQSTLQSEEFVRLDRL	298
NF-H_HUMAN	SEAAKVNTDAMRSAQEETIETVRRQLQARTTELEALKSTKDSLERQRSELEDRHQADIASY	360
NF-H_MOUSE	SEAAKVNTDAMRSAQEETIETVRRQLQARTTELEALKSTKESLERQRSELEDRHQADIASY	358
NF-H_HUMAN	QEAIQQLDAELRNTKWEEMAAQLREYQDLNVMKALDIEIAAYRKLLEGEECRIGFGPIPF	420
NF-H_MOUSE	QDAIQQLDSELRNTKWEEMAAQLREYQDLNVMKALDIEIAAYRKLLEGEECRIGFGPSPF	418
NF-H_HUMAN	SLPEGLPKIPSVSTHIKVKSEKIKVVEKSEKETVIVEEQTEETQVTEEVTEEEKEAKEA	480
NF-H_MOUSE	SLTEGLPKIPSIKVKSEEMIKVVEKSEKETVIVEGQTEEIRVTEGVTEEDKEAQG	478
NF-H_HUMAN	EEGKEEGEGEEEAEGGEEETKSPPAEEAASPEKEAKSPVKEEAKSPAEAKSPEKEEAKS	540
NF-H_MOUSE	QEGEAEEGEKEEEGA-AATSPPAEEAASPEKETSRVKEEAKSPGEAKSPGEA--KS	535
NF-H_HUMAN	PAEVKSPEKAKSPA-----KEE-----AKSPPEAKSPEKEEAKSPA	584
NF-H_MOUSE	PAEAKSPGEAKSPGEAKSPGEAKSPAEPKSPAEPKSPAEPKSPAEPKSPAEPKSPAEPKSPA	593
NF-H_HUMAN	KSPAKE-----EAKSPA	612
NF-H_MOUSE	KSPAKE-----EAKSPA	653
NF-H_HUMAN	KSPAKE-----EAKSPA	657
NF-H_MOUSE	KSPAKE-----EAKSPA	713
NF-H_HUMAN	---EEAKSPEKAKSPVK-----AEAKSPEKAKSPVKAEAKSPEKAKSPVKEEAKS	704
NF-H_MOUSE	KSPGAEAKSPA	769
NF-H_HUMAN	PEKAKSPVKEE-----AKSPEKAKSPVKEEAKTPEKAKSPVKEEAKSPEKAKSPEKAKT	758
NF-H_MOUSE	PEKAKTPEKAKSPEKAKSPEKAKSPEKAKSPEKAKSPEKAKSPEKAKSPEKAKSPEKAKS	829
NF-H_HUMAN	LDVKSPEAKTPEKAKSPEKAKSPEKAKSPEKAKSPEKAKSPEKAKSPEKAKSPEKAKS	817
NF-H_MOUSE	LDVKSPEAKTPEKAKSPEKAKSPEKAKSPEKAKSPEKAKSPEKAKSPEKAKSPEKAKS	883
NF-H_HUMAN	EEVKSPEKAKSPEKAKSPEKAKSPEKAKSPEKAKSPEKAKSPEKAKSPEKAKSPEKAKS	877
NF-H_MOUSE	EEVKSPEKAKSPEKAKSPEKAKSPEKAKSPEKAKSPEKAKSPEKAKSPEKAKSPEKAKS	936
NF-H_HUMAN	KEPVAEKPESKVEAKKEEAEDKKVPTPEKEAPAKVEVKEADAKPKEKTEVAKPEPDDAK	937
NF-H_MOUSE	KETPTPEKPKDSTAEAKKEEAGEKKKAVASEEETPAKLGVKEEAKPKEKTETTKTEAEDTK	996
NF-H_HUMAN	AKEPSKPAEKKE-----AAPEKKTKEE---KAKKPEEKPKTEAKAKEDDKTSLSEPS	987
NF-H_MOUSE	AKEPSKPTETEKPKKEEMPAPEKKTKEEKTESRKPEEKPKMEAKVKEDDKSLSKEPS	1056
NF-H_HUMAN	KPKAEAKSSSTDQKDSKPPPEKATEDKAAKGG-	1020
NF-H_MOUSE	KPKTEAKSSSTDQKESQPPEKTTEDKATKGEK	1090

Alineamiento de aminoácidos de la cadena pesada de neurofilamento (NF-H) hecha con Clustal Omega versión 1.2.4. Ambas proteínas contienen el sitio de reconocimiento KFERQ (rojo) indicando que este dominio puede ser sustrato de la CMA. El análisis de reconocimiento de los sitios KFERQ fue hecho utilizando el software GOMBAR KFERQ de la Dra. Ana María Cuervo. El análisis fue donado por el Dr. Iván Alfaro de la fundación Ciencia y Vida. La secuencia polipeptídica analizada corresponde al neurofilamento pesado de Homo sapiens NCBI NP\_066554.2 y *Mus musculus* (ratón) NCBI NP\_035034.2

## **HIPÓTESIS**

La autofagia mediada por chaperona aumenta el crecimiento axonal de motoneuronas y los niveles de proteína NF-H, y dicho aumento es potenciado por la agregación de la proteína TDP-43.

## **OBJETIVOS**

### **8. OBJETIVO GENERAL**

Determinar en la línea celular de motoneuronas NSC-34 si la actividad de la autofagia mediada por chaperona (CMA) regula el crecimiento axonal y los niveles de proteína NF-H, y determinar si dicha regulación es afectada por la agregación de la proteína TDP-43.

### **9. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Evaluar la actividad de la vía de CMA mediante estímulos de activación en la línea celular NSC-34.
2. Determinar si la actividad de la vía de CMA regula el crecimiento axonal de la línea celular NSC-34 y los niveles de proteína NF-H.
3. Determinar si la agregación de TDP-43 afecta la actividad de la vía de CMA, el desarrollo axonal y los niveles de proteína NF-H.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **10. Línea celular de motoneuronas NSC-34**

Se utilizó la línea celular híbrida NSC-34 producida por la fusión de neuroblastoma y células primarias de medula espinal de ratón enriquecidas en motoneuronas y una que expresa establemente un fragmento de 25 kDa del C-terminal de TDP-43 fusionado a la proteína GFP, las que fueron generosamente provistas por el Dr. Ángelo Poletti, Universidad de Milán, Italia. Las células fueron cultivadas en medio SIGMA alto en glucosa (Glucosa 25mM, Piruvato 1mM, bicarbonato al 0,15 %, pH fisiológico) suplementado con 10 % (v/v) de suero fetal bovino (FBS), 100 U/mL penicilina y 100 ug/mL de estreptomina (Gibco) (Maier et al., 2013) a 37° C con atmósfera de aire humidificada y al 5 % en Dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Cada 2 días se renovó el medio de cultivo. Los análisis se comenzaron a una confluencia de entre el 60 % y 80 %. El grupo control de células NSC-34 fue mantenida en medio de proliferación al 10 % (v/v) de FBS. Para determinar un óptimo estado de diferenciación, se permitió que las células crecieran durante un periodo de 10 días. Cada 24 h se tomó muestras de células para el análisis de proteínas y mRNA.

### **11. Diferenciación de la línea celular NSC-34**

Las primeras 24 h, el cultivo celular se mantuvo con medio suplementado al 10 % (v/v) de FBS (células no diferenciadas). Luego las células fueron lavadas con solución amortiguador fosfato salino PBS (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM; pH 7,4) previamente ambientada a 37° C en baño termoregulado. Para diferenciar las células se utilizó el medio SIGMA descrito anteriormente, pero suplementado con concentraciones de 1 % y 0.5 % (v/v) de FBS (medio de diferenciación) (Maier et al., 2013), durante diferentes tiempos, 1, 3, 6, y 8 días. La diferenciación fue determinada evaluando el desarrollo y prolongación de la neurita.

## **12. Estímulo de activación de la CMA**

Para la caracterización de la activación de la CMA en la línea celular NSC-34, las células fueron sembradas sobre vidrio de 15 mm previamente tratado con poli-D-lisina (PDL) a una concentración de 50 mil células en placa de 6 pocillos y mantenidas por 24 h con medio SIGMA suplementado con 10 % (v/v) de FBS. Para inducir la activación de la CMA, las células fueron lavadas una vez con PBS y se adicionó medio SIGMA al 0 % (v/v) de FBS por un periodo de entre 6 h a 6 días. La actividad CMA fue determinada evaluando la localización perinuclear de la proteína LAMP2A mediante inmunofluorescencia indirecta según protocolo descrito más abajo.

## **13. Infección de la línea celular NSC-34 (Knock-down LAMP2A)**

Para la infección de la línea celular, se sembró en una placa de 6 pocillos  $5 \times 10^5$  células NSC-34 y se mantuvieron con 1 mL de medio SIGMA suplementado con 10 % (v/v) de FBS, renovando el medio de cultivo cada 24 h. Una vez que se alcanzó una confluencia de 70 % se procedió a agregar 100  $\mu$ L y 200  $\mu$ L de partículas lentivirales portadores de los plásmidos pGFPshLAMP2A y pGFPshEMPTY control (vector vacío) generados por el laboratorio colaborador del Dr. Iván Alfaro, investigador en el laboratorio de Biología Lisosomal y Autofagia en la fundación Ciencia y Vida. La cantidad de virus utilizada fue calculada según las unidades necesarias de transducción viral (M.O.I. 10). Las células se mantuvieron por 24 h a 37° C con una atmosfera de 5 % CO<sub>2</sub>. Pasadas las 24 h se observa la placa directamente en un microscopio de fluorescencia. Una alta fluorescencia (GFP) es indicativo de una buena transducción. Las células son removidas mecánicamente con pipeta y llevadas a placas de 100 mm con 8 mL de medio de cultivo Sigma suplementado con 10 % (v/v) de FBS y son dejadas crecer hasta una confluencia de 90 % antes de ser removidas nuevamente para ser utilizadas y congeladas a -80° C.

## **14. Inmunofluorescencia indirecta**

La línea de motoneuronas NSC-34 fue sembrada en placas de 12 pocillos a una concentración de  $5 \times 10^5$  células sobre vidrio de 15 mm previamente tratado con poli-D-lisina (PDL) las que fueron mantenidas por un periodo de tiempo de 6 h, 1, 3, 6 y 8 días,

procurando un crecimiento de un 50 % de confluencia. Se mantuvieron pocillos con 10 % (v/v) de FBS (control); 1 % y 0,5 % (v/v) de FBS (condición diferenciación) y 0 % (v/v) de FBS (condición de activación de CMA). Completado cada uno de los tiempos, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4 % por 20 minutos a temperatura ambiente, permeabilizadas con Tritón X-100 al 0,1 % (v/v) por 5 minutos en hielo. Las uniones no específicas fueron bloqueadas con BSA al 2 % (m/v) en PBS (filtrado) durante 20 minutos a temperatura ambiente (BSA; Sigma, Alemania). Las células fueron incubadas con anticuerpo primario anti-neurofilamento no fosforilado (monoclonal,  $\alpha$ -ratón SMI-32; 1:250 Abcam, USA), y  $\alpha$ -LAMP2A ( $\alpha$ -conejo; 1:250 Abcam, USA) a 4° C durante toda la noche. Posteriormente las células fueron lavadas 3 veces con PBS e incubadas con anticuerpo secundario fluorescente Alexa Fluor 488 anti-conejo y Alexa Fluor 594 anti-ratón (Invitrogen, USA), ambos utilizados a una dilución 1:500, en oscuridad durante 2 h. Se lavaron 3 veces con PBS. Para la tinción de núcleos celulares se utilizó Hoechst 33342 (1:10000; Invitrogen, USA). Finalmente, los vidrios de 15 mm fueron montados en portaobjetos utilizando medio DAKO como montaje. Las fotos fueron tomadas con microscopio de epifluorescencia invertido Ti-s y confocal Carl Zeiss modelo LSM 700 (Alemania).

## **15. Preparación de extractos celulares totales**

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos a una concentración variable de células con el fin de llegar a una confluencia de un 80 % ó 90 % al finalizar el experimento. Finalizado el plazo experimental, las células se lavaron tres veces con solución amortiguador fosfato salino PBS y se lisaron con amortiguador de lisis RIPA (50 mM Tris-HCL, pH 7,4, 1 mM EDTA, 1 % (v/v) Nonidet p-40) (Sigma, Alemania), suplementado con inhibidores de proteasas 2X (complete Mini, Roche, Mannheim, Alemania). El homogenizado se transfirió a un tubo Eppendorf y se centrifugó a 350 g durante 5 min a 4° C. El sobrenadante se recuperó en un nuevo Eppendorf y la determinación de la concentración de proteína se llevó a cabo con el kit de ensayo de proteínas BCA™ (Pierce, Bonn, Alemania), según el protocolo de manufactura. Finalmente, el extracto de proteínas se denaturó a 95°C por 5 min en solución de carga SDS-PAGE 5X (Tris-HCl 2M pH 6,8; glicerol 30 % (v/v); 2 mercaptoetanol 5 %; SDS 10 %; azul de bromofenol 0,02 %), para ser utilizado inmediatamente o almacenado a -20° C.

## **16. Aislamiento de la fracción citosólica S100 para evaluar actividad CMA**

Las células se sembraron en placas de 100 mm y se mantuvieron en medio de crecimiento SIGMA 10 % (v/v) de FBS en presencia de tetraciclina por un período de 72 h desde el momento de sembrarlas y así poder obtener un aumento significativo de los agregados citoplasmáticos de 25 kDa y posterior a este tiempo, activamos la CMA por privación de suero y medimos los niveles de proteína GAPDH (proteína blanco de degradación por actividad CMA). (Seki et al., 2012). Pasado este tiempo, según correspondió, se reemplazó el medio de cultivo por uno 0 % (v/v) de FBS sin tetraciclina. Una vez finalizado el estímulo, y a una confluencia celular superior al 80 %, las placas fueron lavadas 3 veces con PBS a 4° C. Posteriormente, las células fueron arrastradas con una espátula y se recolectaron en 1 ml de PBS frío en tubos Eppendorf. Luego, las células se centrifugaron a 350 g durante 10 min a 4° C, el sobrenadante fue descartado, y se agregó solución hipotónica medio LS (Hepes 28 mM pH 7,3; Acetato de Potasio 5 mM; Cloruro de Magnesio 0,5 mM). A continuación, las células fueron agitadas unos segundos para resuspender el pellet celular. Luego de 20 min en hielo, las células son lisadas mediante un cavitador de nitrógeno durante 8 min a 250 psi con el fin de lisar la célula y dejar expuestos sus organelos citoplasmáticos. Cada muestra fue recolectada en tubos Eppendorf especiales para ser sometidas a una fuerza de 100.000 g en ultracentrífuga por 1 h a 4° C. Finalmente, el sobrenadante (fracción S100) fue recolectado y la concentración de proteína obtenida fue cuantificada por método BCA de acuerdo con protocolos del fabricante. Los niveles proteicos de GAPDH y de la subunidad NF-H fueron evaluados mediante Western blot según protocolo descrito más abajo.

## **17. Transcripción reversa (RT) y reacción en cadena de polimerasa (qPCR)**

Las líneas celulares de motoneuronas transducidas NSC34-GFP-shLAMP2A y NSC34-GFP-shEMPTY fueron cultivados en un periodo de entre 1 a 16 días en medio de cultivo SIGMA suplementado con 10 % (v/v) de FBS. Posteriormente, las células fueron recolectadas con PBS y centrifugadas para obtener un pellet celular. A continuación, se extrajo RNA total mediante protocolo de TRIZOL de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Para la síntesis de cDNA se utilizó 1 µg de RNA, el que fue sometido a

transcripción reversa usando el kit Promega M-MLV RT más random primers (Roth, Alemania).

La expresión de genes fue medida usando la reacción en cadena de la polimerasa (qPCR) technology (BioRad, Germany), más el kit plus SYBR (Quantitative, UK) y un protocolo de estandarización como se describe en (Jolla, 2004).

Para cada gen, la especificidad de los partidores, y la amplificación de un único producto de PCR, se evaluó mediante una curva de disociación (*melting curve*). (**Tabla 7**). Para esto, se realizaron diluciones seriadas de cDNA de 1:1, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10.000. Posteriormente, se realizó un qPCR utilizando el kit KAPA SYBR FAST qPCR (KAPABIOSYSTEMS). La concentración de los partidores utilizada fue de 10 ng/μL de iniciador hacia adelante 5'- AGG TGC TTT CTG TGT CTA GAG CGT -3' e iniciador reverso 5'-AGA ATA AGT ACT CCT CCC AGA GCT GC-3' del gen LAMP2A mouse. Los niveles de LAMP2A fueron normalizados contra la amplificación de ACTINA Mouse usando el iniciador hacia adelante 5'-ATC TTC TCC ATG TCG TCC CAG TTG-3' e iniciador reverso 5'- AAG GAC TCC TAT AGT GGG TGA CGA -3'. La cuantificación relativa se realizó calculando la proporción normalizada del gen de interés (mLAMP2A) con respecto a la expresión normalizada de un gen de referencia housekeeping actina de ratón (mACTINA). Para cada uno de los ensayos se generó una curva estándar con la dilución de cada gen blanco. Los datos se presentan como el “cambio en los niveles de expresión”, los cuales fueron determinados con la utilización del método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Schmittgen & Livak, 2008). Se obtuvieron los valores de umbral de ciclo (Cycle threshold; Ct) para cada gen control en cada muestra y se transformaron en cantidades por el método comparativo Ct. Los datos fueron expresados como cantidad del blanco con la cantidad relativa de housekeeping. Los genotipos fueron medidos en triplicado y comparados usando t-test no pareado con el software GraphPad Prism 6.0.

**Tabla 7. Programa de amplificación**

Etapa	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (Min:seg)	N° ciclos
1	1	60	2:00	1
2	1	95	10:00	1
3	1	95	00:15	1
	2	60	01:00	45

## 18. Electroforesis en gel de poliacrilamida

La separación de las proteínas según su masa relativa se realizó en geles de poliacrilamida. Se cargó la misma cantidad total de proteínas (10-20 ug por carril) previamente denaturadas a 95° C por 5 min en solución de carga SDS-PAGE 4x (Tris-HCl 25 mM pH 7,5; glicerol 32 % v/v; 2 mercaptoetanol 20 %; SDS 9,2 %; azul de bromofenol 0,02 %). El gel utilizado fue de poliacrilamida al 10 % (v/v) con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) y la electroforesis se realizó en solución de electroforesis 1X (Tris-Base 0,3 % (p/v), glicina 1,44 % (p/v), SDS 0.1 % (p/v); pH 8,6) a 80 Voltios durante los primeros 20 min y luego a 100 V hasta la caída del frente de corrida.

## 19. Electrotransferencia de proteínas

Las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa de poros de 0,45 µm (Roche, Alemania), usando el equipo de transferencia electroforética Trans-Blot<sup>R</sup> semi seco (Bio-Rad, USA), durante 10 min. La solución de transferencia fue (Tris 25 mM; glicina 192 mM; metanol 20 %). Completado el proceso, se tiñó la membrana con rojo Ponceau al 5 % (v/v) para verificar la transferencia de las proteínas. Luego se eliminó el Rojo Ponceau con lavados de TBS Tween 0,1 % (Tris-Base 0,224 % (p/v), NaCl 0,8 % (p/v), Tween 20 0,1 % (v/v) cada uno por 5 minutos.

## 20. Western blot (detección de proteínas)

Las membranas de nitrocelulosa fueron incubadas con BSA 2 % (m/v) en PBS durante toda la noche a 4° C con agitación suave para bloquear los sitios de unión no específicos. Posteriormente se incubaron las membranas durante toda la noche a 4° C con anticuerpo primario anti-neurofilamento pesado (NF-H) no fosforilado (SMI-32, 1:2000; Abcam, USA), anti LAMP2A (1:2500, Invitrogen, USA), anticuerpo anti-β-actina (1:5000; Sigma, Alemania), anticuerpo anti-GAPDH (1:1000, Invitrogen, USA) diluidos en TBS Tween 0,1 % (v/v) y BSA al 2 % (m/v) (**Tabla 8**). Luego, las membranas de nitrocelulosa se lavaron 3 veces con TBS Tween 0,1 %, para proseguir con la incubación

de los anticuerpos secundarios en TBS Tween 0,1 % durante 45 minutos a temperatura ambiente. La membrana se lavó 3 veces, 5 minutos cada vez. La actividad peroxidasa fue visualizada usando el método potenciador de quimioluminiscencia ECL™ de acuerdo con el protocolo estándar (Amersham Pharmacia Biotech, Alemania). Luego las membranas fueron expuestas en el sistema de adquisición y análisis de imágenes (fotodocumentador Li-Cor modelo Odyssey FC,) para revelar la señal semicuantitativa de expresión de proteínas. Anticuerpos utilizados (**Tabla 8**). En la cuantificación relativa de proteínas, la intensidad de cada banda se evaluó con el programa ImageJ.

**Tabla 8. Anticuerpos utilizados.**

Anticuerpos	Tipo	Dilución	Marca	Cat #
SMi-32	Primario	1:2000	Abcam	Ab8135
LAMP2A	Primario	1:2500	Invitrogen	PA1-655
GAPDH	Primario	1:1000	Invitrogen	MA1-16757
β-Actina	Primario	1:2500	Abcam	Ab219733
Anti Rabbit Alexa 488	Secundario	1:10000	Invitrogen	A32731
Anti Mouse Alexa 594	Secundario	1:10000	Invitrogen	42-4812-82

21.

**Análisis estadísticos**

Los resultados

fueron evaluados utilizando el software GraphPad Prisma 6. Para análisis estadísticos los datos fueron tratados mediante ANOVA de una y dos vías. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas con  $p < 0.05$ . Los datos fueron expresados como promedio  $\pm$  SEM de al menos 3 experimentos independientes. ( $n \geq 3$ ). Para el caso de las fotografías, éstas son imágenes representativas de al menos 3 experimentos independientes ( $n \geq 3$ )

## RESULTADOS

### 22. Actividad de la vía de autofagia mediada por chaperonas. Proteína LAMP2A, la componente clave

Es importante reiterar que la autofagia mediada por chaperonas solo ha sido descrita en mamíferos y que, la componente limitante de esta vía autofágica es la proteína LAMP2A (Patel & Cuervo, 2015). Diferentes reportes han demostrado que la activación de CMA se correlaciona usualmente con la redistribución de lisosomas positivos para LAMP2A en el perinúcleo celular (Patel & Cuervo, 2015; Cuervo & Dice, 2000; Li et al., 2017; Kaushik; & Cuervo, 2009). Es por lo anterior que se evaluó la activación de la CMA mediante la redistribución de lisosomas en la línea celular NSC-34.

### 23. Estímulo y evaluación de la activación de la vía CMA

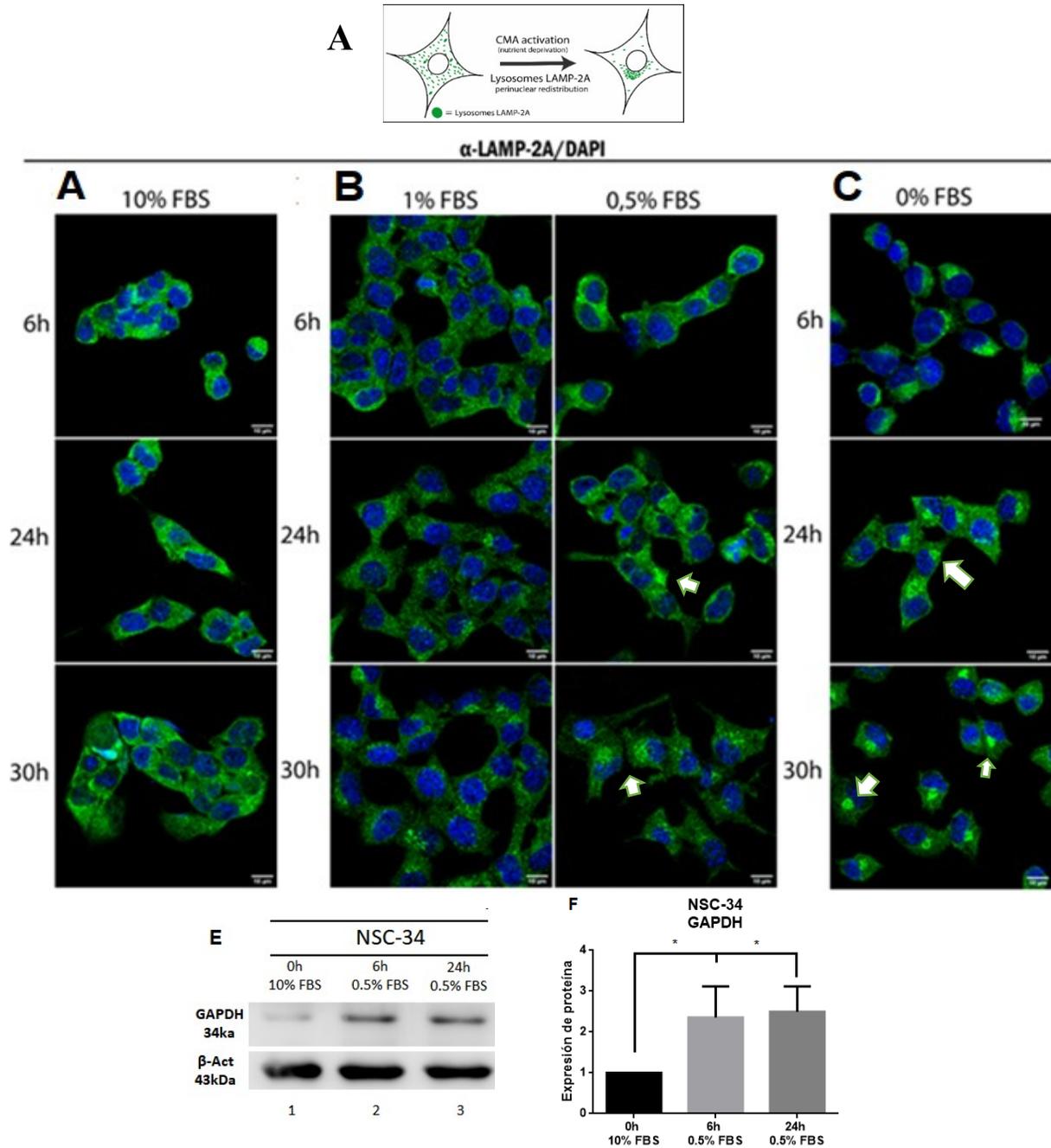
Para evaluar la activación de la CMA en la línea celular de motoneuronas NSC-34 (**Figura 10A**) utilizamos dos técnicas. La primera, de inmunofluorescencia indirecta en donde los lisosomas de las células fueron marcados con anticuerpo específico anti-LAMP2A (verde), el cual reconoce específicamente la porción de 12 aminoácidos que constituyen el tallo citosólico de LAMP2A, mientras que el núcleo celular fue teñido con el marcador fluorescente Hoechst 33342 (azul). Las células fueron estimuladas a distintas concentraciones de FBS durante 6, 24 y 30 h. De esta forma analizamos la distribución de estos lisosomas marcados alrededor del perinúcleo celular.

En la **Figura 10B - 10D** observamos columnas de imágenes representativas de los experimentos de inmunofluorescencia indirecta. Si se compara la **Figura 10B** (grupo control al 10 % (v/v) de FBS) con la **Figura 10C** (grupo al 1 % y 0,5 % (v/v) de FBS), no es posible observar cambios en la redistribución perinuclear de lisosomas positivos para LAMP2A a los tiempos 6, 24, 30 h. Sin embargo, al comparar la **Figura 10B** con la **Figura 10D** (grupo al 0 % (v/v) de FBS) se observó que aquellas células que fueron mantenidas durante 24 y 30 h sin suero presentaron una reorganización perinuclear de lisosomas positivos para LAMP2A (puntos muy verdes alrededor del núcleo en comparación a la condición control). Adicionalmente, la **Figura 10C**, es interesante mencionar que las células que fueron

mantenidas a una concentración de 0.5 % (v/v) de FBS, (condición de diferenciación) presentaron una leve redistribución (aumento de fluorescencia perinuclear) de lisosomas positivos para LAMP2A, probablemente debido a que las células consumían rápidamente la baja cantidad de FBS agregado y renovado cada 24 h. Es importante destacarlo porque es la concentración de suero a la cual se ha reportado que la línea celular NSC-34 presenta crecimiento axonal (Maier et al., 2013).

La segunda técnica fue complementaria en tiempo y concentraciones de FBS a la técnica experimental anterior y consistió en cuantificar mediante Western blot los niveles de la enzima GAPDH (indicador maestro de actividad CMA) (Seki et al., 2012). En cuanto a los niveles de GAPDH, la condición 0,5 % (v/v) de FBS causó un aumento de los niveles de GAPDH a partir de las 6 h (**Figura 10E**).

En conjunto, estos resultados nos permiten concluir que el estresor por privación de nutrientes redistribuye lisosomas LAMP2A en el perinúcleo celular dando cuenta de una activación de la CMA en nuestro modelo de estudio (aún es necesario realizar una cuantificación de esta observación). Sin embargo, el análisis proteico de GAPDH indica que la actividad CMA se inhibiría al ser estimulada por privación de nutrientes. El porqué de esta discrepancia será discutido más adelante.



**Figura 10. Activación de la CMA en la línea celular de motoneuronas NSC-34.** Mediante inmunofluorescencia indirecta se determinó la relocalización perinuclear de lisosomas positivos para LAMP2A de células NSC-34 mediante incubación de las células por 6, 24 y 30 h en medio de cultivo suplementado con diferentes concentraciones 0 %; 0,5 %; 1 % y 10 % (v/v) de FBS. Las células se trataron con anticuerpo α-LAMP2A (color verde) y Hoetsch 33342 (color azul) para teñir los lisosomas y los núcleos celulares respectivamente. **(A)** Figura representativa de la redistribución perinuclear de lisosomas positivos para LAMP2A producida por privación de nutrientes. (Adaptado de Budini et al., 2014). **(B)** células mantenidas por 6, 24 y 30 h de incubación en medio SIGMA suplementado con 10 % (v/v) de FBS. **(C)** Células mantenidas por 6, 24 y 30 h de incubación en medio SIGMA suplementado

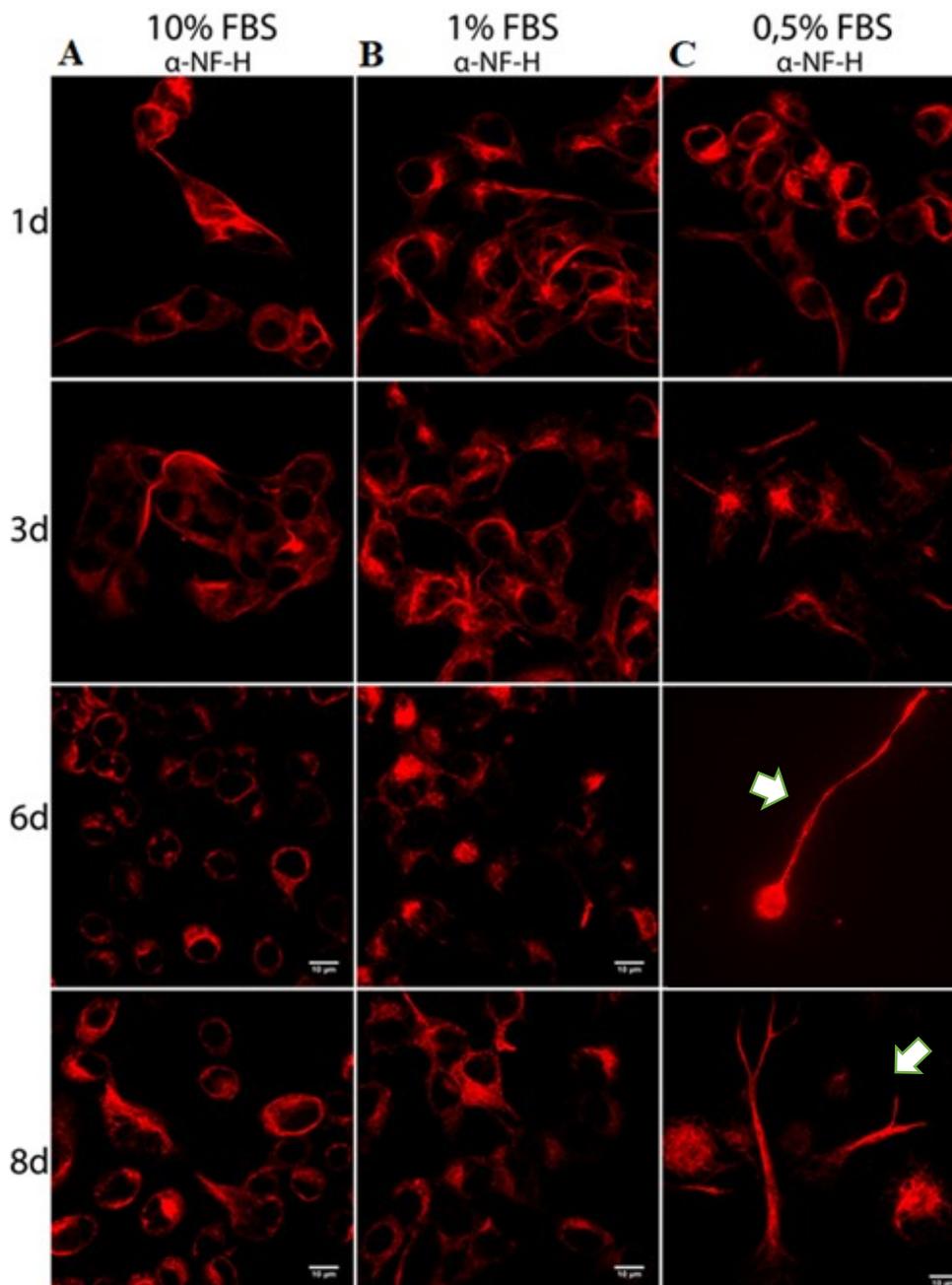
con 1 % y 0,5 % (v/v) de FBS. **(D)** Células mantenidas por 6, 24 y 30 h de incubación en medio SIGMA sin suplementar 0 % (v/v) de FBS. Las imágenes corresponden a un promedio (n= 5). Barra de escala = 10  $\mu$ m. **(E)** Imagen representativa de Western blot. Anti  $\beta$ -Actina (control de carga). Las células fueron cultivadas por 72 h con 10 % (v/v) de FBS (tiempo 0) y luego incubadas por 6 y 24 h con 0,5 % (v/v) de FBS. Fracción citosólica (S100) de NSC-34 para evaluar los niveles de GAPDH, proteína que mide indirectamente la actividad CMA. **(F)** Cuantificación de GAPDH /  $\beta$ -Actina. Los resultados corresponden al promedio  $\pm$  error estándar medio (n = 4). Se utilizó análisis de ANOVA de una vía \*  $p < 0,05$

#### **24. Actividad de la autofagia mediada por chaperonas en el crecimiento axonal.**

Como se ha mencionado, existe una relación entre la inactivación del proceso CMA en el cerebro con un incremento en la neurodegeneración (Hara et al., 2006; Komatsu et al., 2006). El proceso de reciclaje de proteínas mediante CMA disminuye progresivamente con el envejecimiento, probablemente contribuyendo a la acumulación de proteínas con características alteradas en el tejido de organismos envejecidos. (Kaushik; & Cuervo, 2009). La mayoría de las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por la presencia de agregados celulares de proteínas aberrantes o mal plegadas. En el caso concreto de ALS, se postula que dichos agregados y sus precursores oligoméricos alteran el normal funcionamiento celular, induciendo un grado de estrés oxidativo que resulta perjudicial para la célula ya que, interfiere con sus funciones básicas y conduce finalmente a la muerte de la neurona. Las señales extracelulares son muy importantes para activar los receptores de membrana para inducir la neurogénesis o la formación de extensiones cilíndricas fuera del cuerpo de la célula neuronal. Estas extensiones cilíndricas sirven como precursoras de axones y dendritas que, una vez formadas, sirven para polarizar la neurona. (Clagett-Dame et al., 2006). El rol de la CMA en las funciones y patogénesis neuronal aún no está del todo dilucidado, en parte porque el rol de la CMA en el desarrollo neuronal permanece incierto.

## 25. Caracterización del crecimiento axonal en la línea celular NSC-34

Para poder determinar si la actividad de CMA regula el crecimiento axonal en la línea celular de motoneuronas NSC-34, procedimos a caracterizar la diferenciación (cambio de morfología) de estas células durante un período de 8 días. Existe evidencia de que la línea celular NSC-34 desarrolla prolongaciones que pueden ser consideradas axones cuando son mantenidas en medio de cultivo suplementado con 1 % y 0,5 % (v/v) de FBS (Maier et al., 2013). Por esta razón cultivamos la línea celular NSC-34 por 1, 3, 6 y 8 días en medio suplementado con 10 % (v/v) de FBS (control); 1 % y 0,5 % (v/v) de FBS (medio de diferenciación). Para observar el crecimiento axonal empleamos la técnica de inmunofluorescencia indirecta utilizando el anticuerpo anti-neurofilamento SMI-32 que reconoce la subunidad pesada del neurofilamento (NF-H). En la **Figura 11A - C** se muestran columnas de imágenes representativas de inmunofluorescencia con el fin de observar el crecimiento axonal. Al analizar cada figura por columna, se aprecia cambio en la morfología de las células, la cual muestra un alargamiento de los axones dendríticos al 6to y 8vo día de cultivo en medio suplementado con 0,5 % (v/v) de FBS (**Figura 11C**). Por el contrario, aquellas células mantenidas en medio de cultivo suplementado con 10 % (v/v) de FBS **Figura 11A** (grupo control) y suplementado con 1 % (v/v) de FBS **Figura 11B** no se aprecia cambio en la morfología de la célula. Lo anterior da cuenta que nuestro modelo de estudio responde a estímulos de diferenciación celular como se ha documentado en las citas ya expuestas.

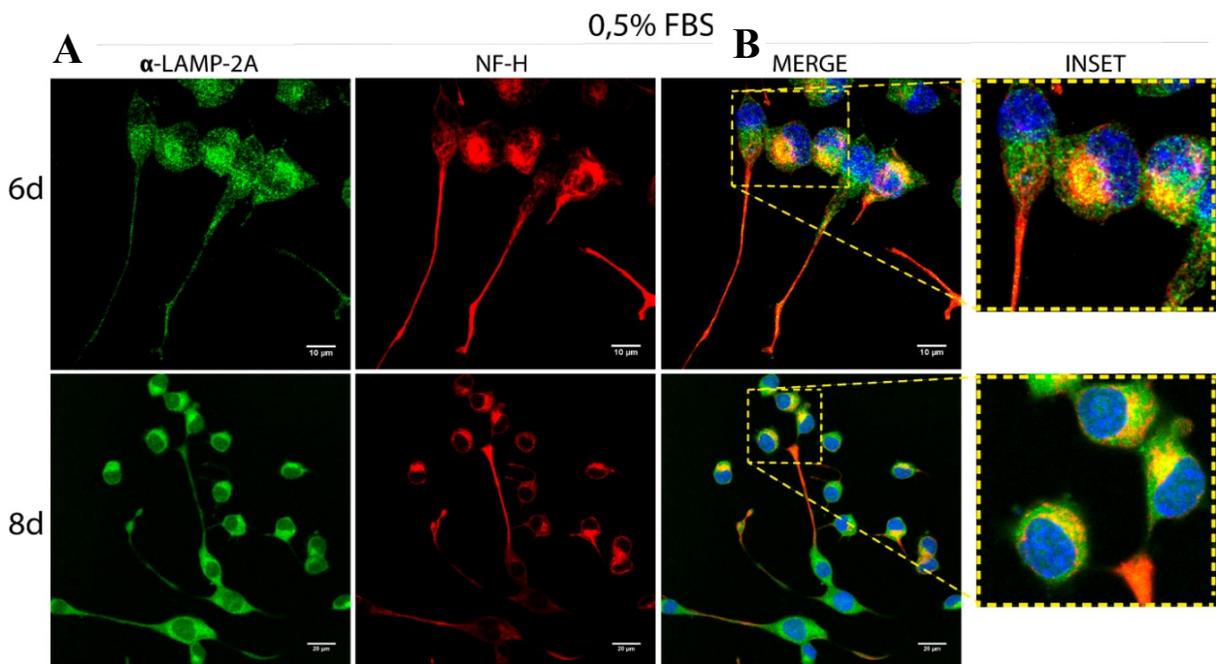


**Figura 11. Crecimiento axonal en la línea celular de motoneuronas NSC-34.** Mediante inmunofluorescencia indirecta, se buscó observar cambio de morfología de la célula, lo cual puede ser visualizado por una reorganización de la proteína de neurofilamento. Las células fueron tratadas con anticuerpo primario anti-SMI-32 (rojo) que tiñe específicamente la subunidad pesada del neurofilamento (NF-H). **(A)** Columna izquierda corresponde a imágenes representativas de células mantenida entre 1 y 8 días en medio de cultivo suplementado con 10 % (v/v) de FBS. **(B)** Columna central corresponde a imágenes representativas de células mantenidas entre 1 y 8 días en medio de cultivo suplementado con 1 % (v/v) de FBS. **(C)** Columna derecha corresponde a imágenes representativas de las células mantenida entre 1 y 8 días en medio de cultivo suplementado con 0,5 % (v/v) de FBS. Las imágenes corresponden a un promedio (n= 3). Barra de escala = 10  $\mu$ M.

## 26. Evaluación de la activación de la CMA durante el crecimiento axonal.

Ya evidenciamos que existe un cambio en la morfología de la célula cuando ésta es mantenida en medio de cultivo suplementado al 0,5 % (v/v) de FBS, por lo que, ahora quisimos evaluar si la actividad de la autofagia mediada por chaperonas se ve afectada por el crecimiento axonal. Decidimos entonces, observar la relocalización perinuclear de lisosomas positivos para LAMP2A en condición de diferenciación mediante inmunofluorescencia indirecta.

En la **Figura 12** se pueden observar imágenes representativas de las células mantenidas por 6 y 8 días de cultivo suplementado con 0,5 % (v/v) de FBS. Las células se trataron con anticuerpo anti-LAMP2A y anti-SMI-32 para teñir los lisosomas y la red de la subunidad pesada del neurofilamento (NF-H) respectivamente. Se evidenció que, tanto al sexto como al octavo día de cultivo es posible observar que algunas células presentan una marcada localización perinuclear de lisosomas a pesar de que el medio de cultivo está suplementado con 0,5 % (v/v) de FBS (**Figura 12A**). En algunas células no es posible evidenciar esta relocalización perinuclear de lisosomas positivos para LAMP2A por lo que los lisosomas se distribuyen más homogéneamente entre el soma y el axón. Respecto a la proteína NF-H se observa un comportamiento de localización que coincide con el de los lisosomas con la CMA activa (**Figura 12A**). Para mayor detalle, se realizó la superposición de las imágenes (señal de lisosomas y señal de NF-H) y se hizo un acercamiento de éstas el cual está indicado con un recuadro de líneas segmentadas de color amarillo (**Figura 12B**). En las células sin crecimiento axonal se observó una fuerte señal de color amarillo en el perinúcleo de la célula, lo que es indicativo de colocalización entre lisosomas y NF-H. Por el contrario, en las células que muestran crecimiento del axón, la señal de color amarillo se debilita, es decir, la localización perinuclear de lisosomas desaparece y se distribuye a lo largo del soma de la motoneurona haciéndose más difusa. Por lo tanto, se puede sugerir que las células con activación de CMA no presentan crecimiento axonal, mientras que aquellas que experimentaron crecimiento del axón tendrían una menor activación de la vía CMA. Sin embargo, es necesario realizar una cuantificación para definitivamente comprobar este hecho.



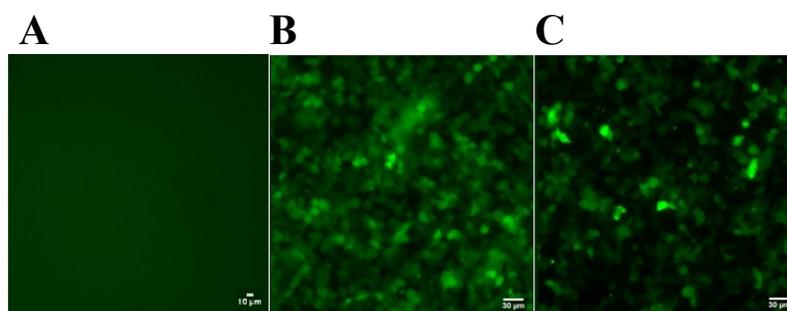
**Figura 12. Efecto de la actividad de la vía de autofagia mediada por chaperonas en el crecimiento axonal.** Utilizando inmunofluorescencia indirecta, se observó colocalización entre lisosomas (LAMP2A) y la subunidad pesada del neurofilamento (NF-H) entre 6 y 8 días de cultivo de la línea celular NSC-34 suplementada con 0,5 % (v/v) de FBS. **(A)** Imágenes representativas de las células que fueron tratadas con anticuerpo anti-LAMP2A (verde) y anticuerpo anti-SMI-32 (rojo) para teñir lisosomas y NF-H respectivamente. El núcleo celular fue teñido con Hoetsch 33342 (Azul). **(B)** Recuadro de líneas segmentadas que amplifica con mayor detalle la colocalización (color amarillo). Las imágenes corresponden a un promedio (n= 3). Barra de escala = 10 μM.

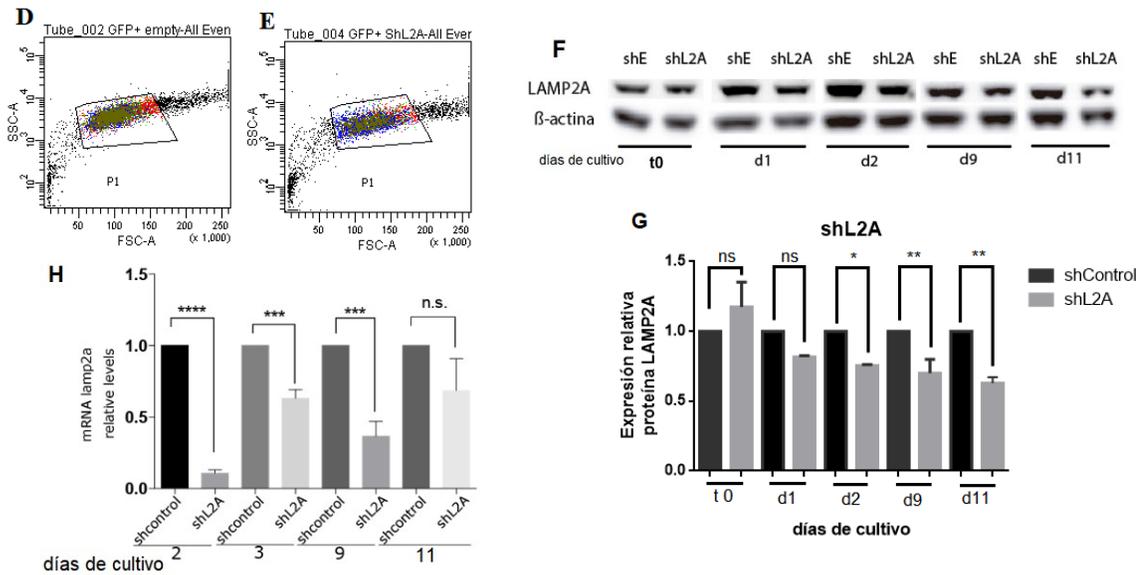
## 27. Línea celular con baja expresión de proteína LAMP2A para determinar crecimiento axonal

Para poder estudiar si el crecimiento axonal de la línea celular NSC-34 es regulado por la actividad de la CMA, se procedió a desarrollar una línea celular NSC-34 con baja actividad de CMA. Lo anterior se llevó a cabo mediante transducción lentiviral de un shRNA específico para el mRNA LAMP2A de ratón shmGFPLAMP2A, de aquí en adelante resumido como (shL2A) y un control de transducción con un vector vacío shmGFPEMPTY de aquí en adelante resumido como (shE). Ambos vectores lentivirales expresan la proteína reportera GFP. En la **Figura 13A** se muestra la línea celular NSC-34 (control), en la **Figura 13B** se muestra la célula NSC-34 transducida con el lentivirus control vacío shE que expresa solo la proteína GFP y en la **Figura 13C** se muestra la célula NSC-34 transducida con el lentivirus

que expresa el shL2A. Posterior a la transducción se procedió a someter a las células a separación celular por citometría de flujo (Cell Sorting) con el fin de seleccionar por un lado solo aquellas células portadoras del shE y por otro lado solo las portadoras de shL2A. En la **Figura 13D y E** se observa que el porcentaje de recuperación de las partículas sorteadas positivas para shE en contraste con células NSC-34 (control) fue de un 77,6 % mientras que, las células positivas para shL2A fue de un 69,4 % (más información en **Figuras suplementaria 1 y 2**). Luego, se procedió a evaluar la eficiencia de las células transducidas con el shL2A en su capacidad para reducir los niveles proteicos de LAMP2A para lo cual se procedió a cultivar las células sorteadas por un período de entre 1 y 11 días en medio SIGMA suplementado con 10 % (v/v) de FBS para hacer seguimiento a los niveles de expresión de la proteína LAMP2A y evaluarlos mediante Western blot (**Figura 13F**). Lo anterior fue comparado con las células shE efectivamente transducida determinando una disminución significativa de los niveles de expresión de proteína LAMP2A en las células transducidas con el vector shL2A mantenidas en cultivo por un periodo de tiempo entre 2 y 11 días (**Figura 13G**).

Posteriormente, se extrajo RNA celular total con el fin de determinar mediante RT-qPCR los niveles relativos de expresión de mRNA de las células transducidas con shL2A. Se observó que, comparado con las células shE las células infectadas con el shL2A tuvieron una reducción significativa en los niveles relativos del mRNA de LAMP2A (**Figura 13H**). Esta disminución en los niveles proteicos, junto con la disminución de los niveles relativos de mRNA de las células efectivamente transducidas con shL2A nos permite concluir que la transducción lentiviral permite disminuir la expresión de la proteína LAMP2A y pueden ser utilizadas para estudiar la relación entre actividad de la CMA y crecimiento axonal.

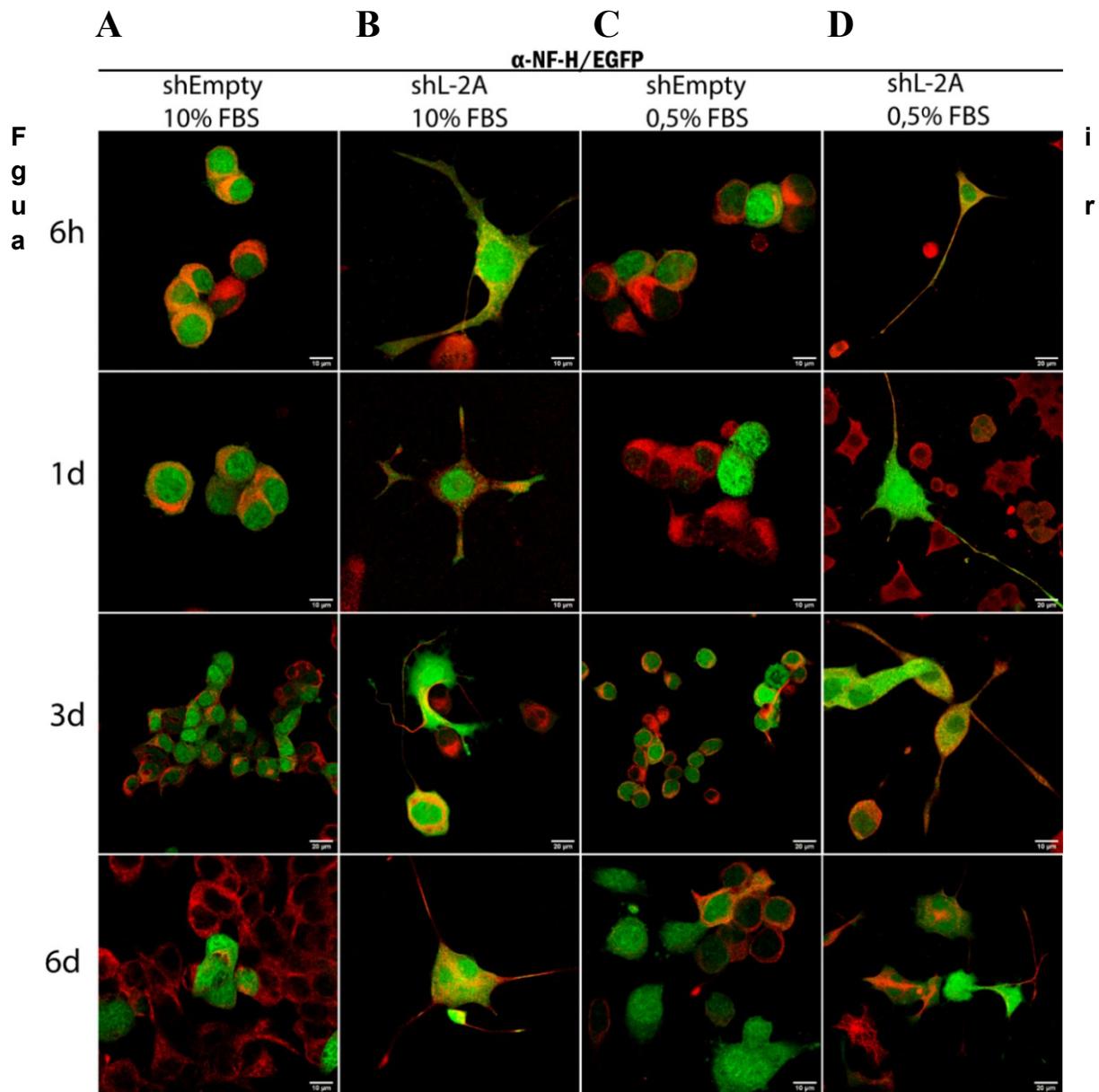




**Figura 13. Células knock-down CMA.** Células NSC-34 se mantuvieron en infección con lentivirus que transporta un vector bicistrónico que expresa un shRNA contra mRNA LAMP2A y la proteína GFP. Además, se usó un vector vacío sin shRNA (control). **(A)** Células NSC-34 sin transducción lentiviral (Control) **(B)** Células NSC-34 transducida con shmGFPEMPTY (shE) **(C)** Células NSC-34 transducida con shmGFPLAMP2A (shL2A). Las imágenes corresponden a un promedio  $n = 3$ . Barra de escala  $30 \mu\text{m}$ . **(D)** Imagen representativa de la separación de poblaciones de células efectivamente transducidas con shE (control). **(E)** Imagen representativa de la separación de la población de células efectivamente transducidas con shL2A.  $n=1$ . **(F)** Imagen representativa de Western blot que muestra los niveles de expresión de la proteína LAMP2A obtenidos de extractos de proteínas totales de las células NSC-34 transducidas con shL2A y células NSC-34 Transducidas con shE (control).  $n = 6$ . Los tiempos seleccionados t0, d1, d2, d9 y d11 son los tiempos de los extremos del experimento que mostraron cambio significativo en los niveles de expresión de proteína. Anti  $\beta$ -Actina (control de carga). **(G)** Cuantificación de la expresión de proteína LAMP2A /  $\beta$ -Actina. Los resultados corresponden  $\pm$  error estándar medio.  $n = 3$ . Para los tres casos se utilizó análisis de ANOVA de una vía, múltiples comparaciones \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ . **(H)** Análisis expresión relativa de mRNA de LAMP2A RT-qPCR representativo. Se usó un primer específico contra cDNA de LAMP2A ratón. Los niveles de expresión de mRNA fueron normalizados con los niveles de expresión del gen que codifica para  $\beta$ -Actina de ratón. Los resultados obtenidos corresponden al promedio de  $C_t \pm$  error estándar medio de cuatro grupos de células NSC-34 ( $n = 4$ ). Se utilizó análisis de t-Student \*\*\*  $p < 0,001$

## 28. Determinación del crecimiento axonal en células NSC-34 con baja expresión de proteína LAMP2A

Habiendo comprobado que las células transducidas con el shL2A presentaron una disminución de niveles de proteína y expresión de mRNA de LAMP2A, se procedió a evaluar el crecimiento axonal de la célula mediante inmunofluorescencia indirecta. Las células se marcaron con el anticuerpo  $\alpha$ -SMI-32 anti-neurofilamento (anti-NF-H) para observar el crecimiento axonal. Se colocaron las células NSC-34 transducidas con shE y con shL2A (baja actividad CMA) en condiciones fisiológicas 10 % (v/v) de FBS y de diferenciación 0,5 % (v/v) de FBS durante 6 h, 1, 3 y 6 días. En la **Figura 14** se pueden observar 4 columnas de imágenes representativas, tanto de células control (shEMPTY) como con baja actividad CMA (shL2A). De forma interesante, y comparadas con el control, se observó que algunas células shL2A desarrollaron prolongaciones axonales a partir de las 6 h en medio de cultivo al 0,5 % (v/v) de FBS (**Figura 14D**). Aún más interesante fue el crecimiento axonal que presentaron las mismas células con baja actividad CMA, pero que fueron mantenidas en medio de cultivo al 10 % (v/v) de FBS (**Figura 14B**), las cuales a partir de las 6h de cultivo presentan crecimiento axonal en comparación a la condición control (**Figura 14A**). En el caso de las células shEMPTY mantenidas en medio suplementado con 0,5 % (v/v) de FBS, estas no desarrollaron neuritas entre las 6 h y 6 días que se desarrolló el experimento (**Figura 14C**), comparadas con las células shL2A (**Figura 14D**). Estos experimentos darían cuenta de un efecto de la CMA en la regulación del crecimiento axonal, sin embargo, es necesario realizar una cuantificación para definitivamente comprobar este hecho.



**14. Determinación del crecimiento axonal en células con baja actividad CMA.** Mediante inmunofluorescencia indirecta se determinó el crecimiento axonal de la línea celular NSC-34 sometida a transducción lentiviral portador del shmGFPLAMP2A contra mRNA LAMP2A (shL2A) y su control lentiviral vacío shmGFPEMPTY (shEMPTY). Las células fueron tratadas con anticuerpo  $\alpha$ -SMI-32 anti-neurofilamento (NF-H) (rojo). Imágenes representativas corresponden a un grupo de ( $n = 3$ ). Barra de escala 10 $\mu$ m. **(A)** Grupo control NSC-34 (shEMPTY) en medio de cultivo suplementado con 10 % (v/v) de FBS. **(B)** Grupo de células NSC-34 con baja actividad CMA (shL2A) en medio de cultivo suplementado con 10 % (v/v) de FBS. **(C)** Grupo de células control NSC-34 (shEMPTY) en medio de cultivo suplementado con 0,5 % (v/v) de FBS. **(D)** Grupo de células NSC-34 con baja actividad CMA (shL2A) en medio de cultivo suplementado con 0,5 % (v/v) de FBS. Todos los análisis mostrados se hicieron entre 6 h y 6 días de cultivo.

## 29. Caracterización de la línea celular NSC-34-GFP-TDP-25

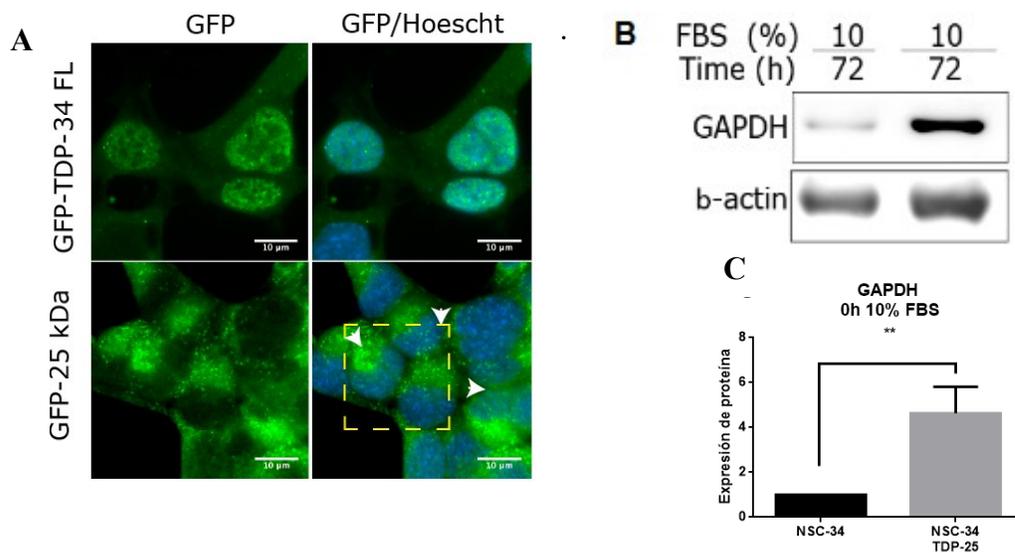
Como se ha documentado, los agregados de TDP-43 podrían actuar como “sumidero” provocando la pérdida de función de la proteína TDP-43 recién sintetizada en la célula, provocando la muerte celular de neuronas y por consiguiente neurodegeneración (Budini et al., 2012). Además, estudios de nuestro laboratorio demostraron que los agregados de TDP-43 alteran la actividad de la CMA (Ormeño et al., 2020). Por lo anterior, nos propusimos estudiar si la agregación de la proteína TDP-43 en las células NSC-34 estaría afectando la actividad de la CMA y en consecuencia el crecimiento axonal. Para poder responder estas interrogantes utilizamos la célula NSC-34-GFP-TDP-25 (gentilmente donada por el Dr. Angelo Poletti, de la Universidad de Milán), la cual expresa mediante inducción con tetraciclina (+TET) agregados de un fragmento de 25 kDa del C-terminal de TDP-43 fusionado a GFP (GFP-TDP-25). Estos agregados han sido descritos en pacientes y son de tipo nuclear citoplasmáticos (Kitamura et al., 2017).

Antes de llevar a cabo los experimentos, las células NSC-34-GFP-TDP-25 fueron caracterizadas. Para ello las células se incubaron con +TET por 72 h y la expresión de los agregados GFP-TDP-25 fueron evaluados por inmunofluorescencia indirecta. En la **Figura 15A** se muestran imágenes representativas de las células tratadas con inducción por +TET de células NSC-34 que expresan agregados TDP-43 (de longitud total) fusionada a GFP que fue utilizada como control (GFP-TDP-43 FL). Comparado con el control se observaron agregados citoplasmáticos en las células NSC-34 que expresan los agregados de 25 kDa por inducción por tetraciclina. Si bien las células con +TET aumentaron la expresión de GFP-TDP-25, pudimos observar que las células -TET tenían una expresión basal de esta construcción. Por tal motivo, para que esa expresión basal no afectara los resultados, en los experimentos siguientes se utilizó como control una línea celular NSC-34 no transfectada con GFP-TDP-25.

## 30. Efecto del agregado TDP-25 en la actividad CMA

Para determinar si los agregados GFP-TDP-25 afectan la actividad CMA, utilizamos ultracentrifugación con el fin de obtener la porción citosólica de las células NSC-34 (control) y NSC34-GFP-TDP-25 y evaluamos mediante Western blot los niveles de la proteína GAPDH. (**Figura 15B**). Se observó que la inducción de agregados produce un aumento significativo de los niveles de GAPDH en la célula NSC34-GFP-TDP-25 mantenida en condiciones

fisiológicas (**Figuras 15B y 15C**). Nuestro modelo de estudio sugiere que las células que expresan la forma agregada de la proteína GFP-TDP-25 tendrían una inhibición de la activación de la CMA. Lo anterior sería concordante con trabajos de nuestro laboratorio que darían cuenta de una inhibición de la activación de la CMA por efecto de agregados citoplasmáticos de TDP-43 en células HEK-293 (Ormeño et al., 2020).

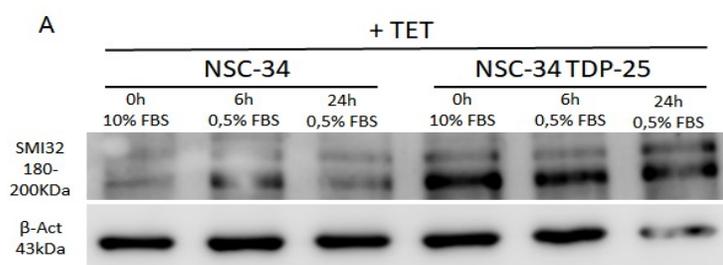


**Figura 15. Efecto del agregado TDP-25 en la actividad CMA.** Las células control y células NSC-34-GFP-TDP-25 fueron cultivadas y mantenidas durante 72 h con inducción por tetraciclina (+TET) (1  $\mu$ L/mL). Luego los extractos totales de proteínas fueron sometidos a ultracentrifugación (100.000g) durante 1 h 10 min a 4° C para obtener la porción citosólica (S100) (**A**) Panel superior corresponde a células NSC-34-TDP-43 FL (control). Panel inferior corresponde a células NSC-34-GFP-TDP-25 que en el recuadro muestra agregados citoplasmáticos de 25 kDa. Imágenes representativas corresponden a un grupo de (n = 3). (**B**) La solución citosólica obtenida fue sometida a Western blot para detectar los niveles de proteínas GAPDH y anti  $\beta$ -actina (control de carga). (**C**) Cuantificación de las señales de GAPDH /  $\beta$ -actina. Imagen representativa de Western blot. Todas las cuantificaciones de las señales corresponden a n = 4. ns: no significativo. Promedio  $\pm$  \*\*p < 0,01

### 31. Efecto del agregado TDP-25 en los niveles de la subunidad pesada de neurofilamento (NF-H)

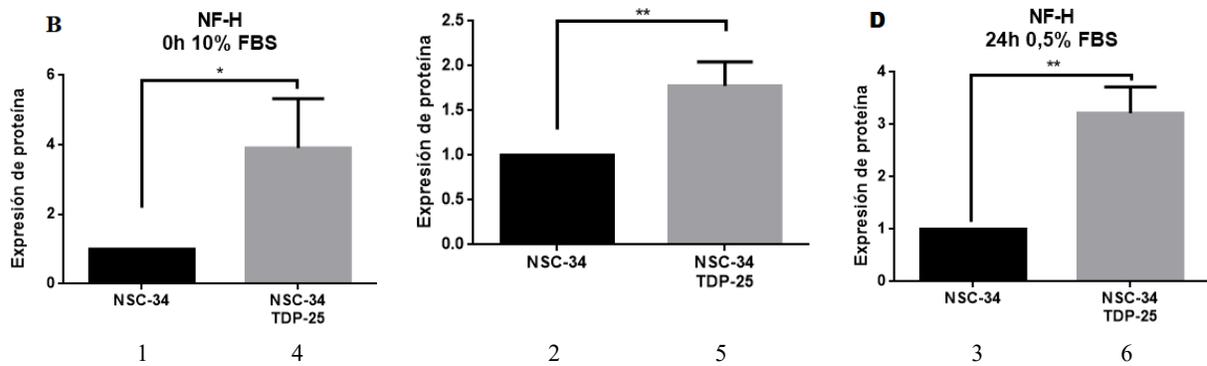
Varias investigaciones señalan que los agregados citoplasmáticos tóxicos de TDP-43 provocan pérdida de motoneuronas, disminución en la formación del axón y reducción del largo de éstos en motoneuronas de pacientes con ALS (Afroz et al., 2017). Se ha sugerido que, la alteración en el axón sería causada por una interacción entre el agregado con el citoesqueleto de las motoneuronas, además de un aumento en los niveles de neurofilamento ligero (NF-L) en etapas tempranas de la enfermedad (Oberstadt et al., 2018). Sin embargo, el efecto de los agregados de TDP-43 sobre la estequiometría de las subunidades de los neurofilamentos podría ser indirecto. Por ejemplo, si los agregados de TDP-43 afectan la actividad de la CMA y el NF-H es un sustrato de la CMA (ya que posee KFERQ), entonces los niveles de NF-H podrían ser alterados producto de una reducida actividad CMA en presencia de agregados de TDP-43. Por lo tanto, nos propusimos evaluar mediante Western blot los niveles de NF-H en las células NSC-34-GFP-TDP-25 utilizando el anticuerpo SMI-32 anti-neurofilamento NF-H que reconoce la porción no fosforilada de 180 kDa – 200 kDa.

La expresión de los agregados de GFP-TDP-25 indujo un aumento significativo de los niveles de proteína NF-H (**Figuras 16A y 16B**). En condición de diferenciación 0,5% v/v de FBS por 6 y 24 h, las células control aumentaron sus niveles de NF-H (**Figuras 16A, líneas 2 y 3 comparadas con 1**). Por otro lado, Los niveles proteicos de NF-H en las células NSC-34-GFP-TDP-25 fueron mayores que el de las células control en condiciones fisiológicas y en condiciones de diferenciación (**Figuras 16A - 16D**). Este último resultado es similar al observado para la enzima GAPDH en las mismas condiciones experimentales (**Figuras 15B y 15C**). Este resultado indica que, en nuestro modelo de estudio NSC-34-GFP-TP-25 se favorece un aumento de los niveles de la proteína NF-H cuando se estimula la formación de los agregados citoplasmáticos de GFP-TDP-25. Este aumento coincide con la elevación de los niveles de la enzima sustrato GAPDH en las mismas condiciones experimentales del experimento anterior, sugiriendo una inhibición de la CMA por parte de los agregados de GFP-TDP-25.



1 2 3 4 5 6

**Figura 16. Efecto del agregado** **C** **NF-H** **6h 0,5% FBS** **IF-H (Western blot). (A) Las**

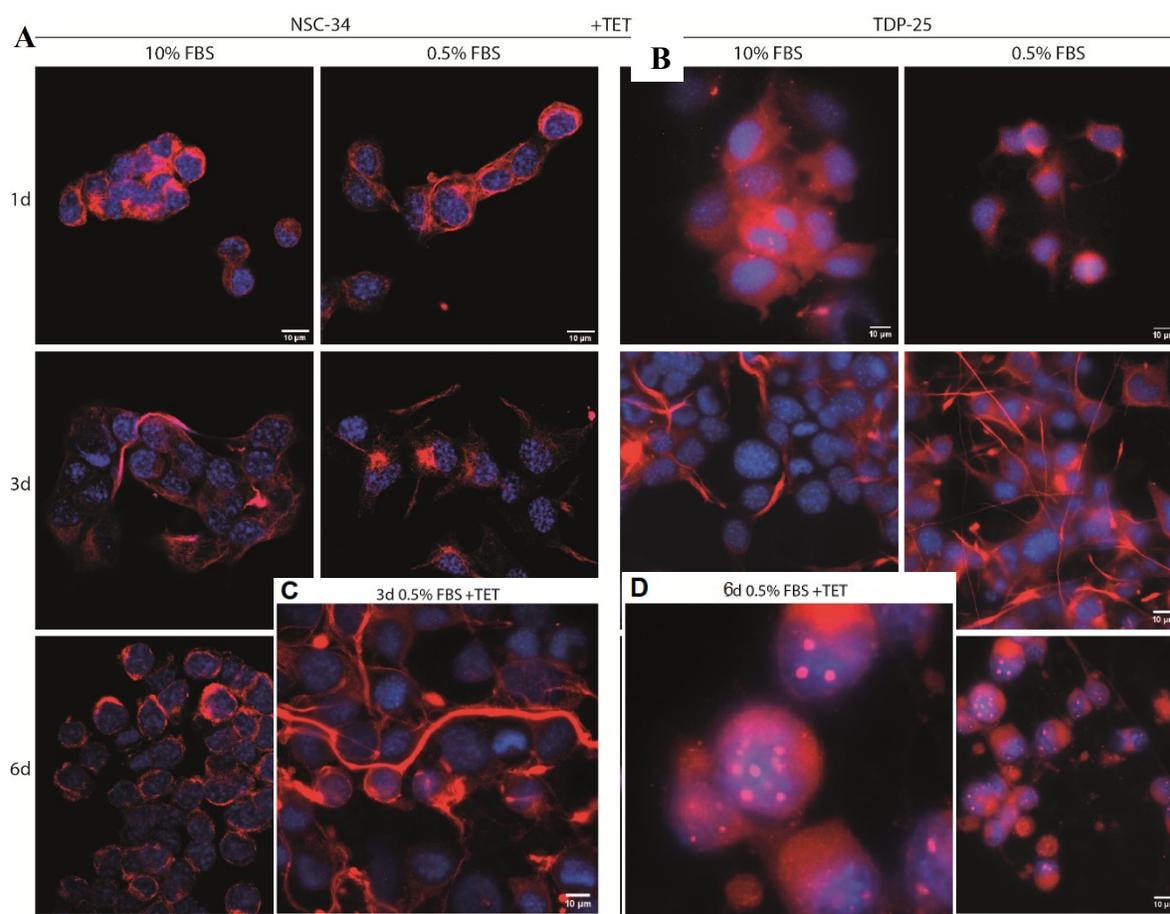


células NSC-34 (control) y células NSC-34-GFP-TDP-25 fueron cultivadas y mantenidas durante 72h con inducción por tetraciclina (+TET) (1 $\mu$ L/mL). Cumplido este periodo de tiempo se estimularon por 6 y 24h con medio de diferenciación 0,5 % (v/v) de FBS. La fracción citosólica fue aislada (S100) sometidos a ultracentrifugación (100.000g) durante 1h10 min a 4° C. Para el Western blot se usó anti-SMI-32 (NF-H) y anti- $\beta$ -actina (control de carga). **(B)** Cuantificación de las señales de NF-H /  $\beta$ -actina, 10 % (v/v) de FBS (condiciones fisiológicas). **(C)** Cuantificación de las señales de NF-H /  $\beta$ -actina, 6h en medio suplementado con 0,5 % (v/v) de FBS. **(D)** Cuantificación de las señales de NF-H /  $\beta$ -actina, 24h en medio suplementado con 0,5 % (v/v) de FBS. Imagen representativa de Western blot. Todas las cuantificaciones de las señales corresponden a n = 4. ns: no significativo. Promedio  $\pm$  \*p < 0,05, \*\*p < 0.01

### 32. Afecto del agregado TDP-25 en el crecimiento axonal.

El neurofilamento se ha descrito como un marcador de daño a axones mielinizados de gran calibre (Zetterberg et al., 2016). Se ha observado que los niveles de NF-L y pNF-H son normales antes del inicio de los síntomas en pacientes de ALS, y aumentan de 5 a 10 veces al inicio temprano de los síntomas en el líquido cefalo raquídeo o el suero (Brettschneider et al., 2006).

Teniendo en cuenta estos antecedentes y el resultado que mostramos anteriormente, determinamos si el aumento en los niveles de proteína NF-H provocados por la inducción de los agregados GFP-TDP-25 se ven reflejados en una alteración del crecimiento axonal. Para lo anterior, llevamos a cabo ensayos de inmunofluorescencia indirecta por 1, 3 y 6 días con concentraciones de 10 % y 0,5 % (v/v) de FBS de células NSC-34 (control) y NSC-34-GFP-TDP-25. Al tercer día de estimulación por tetraciclina, se observó un notorio aumento en el crecimiento axonal de las células NSC-34-GFP-TDP-25 comparado con las células control (**Figura 17A y 17B**). Como se esperaba, las células control solo tuvieron crecimiento axonal al 6<sup>to</sup> día de diferenciación (**Figura 17A**). Sin embargo, las células NSC-34-GFP-TDP-25, a pesar de haber mostrado mayores prolongaciones que las células control al 3<sup>er</sup> día de diferenciación (**Figura 17C**), las mismas sufrieron un “colapso” de los axones al 6<sup>to</sup> día, evidenciado por cúmulos (o agregados) de la proteína NF-H (**Figura 17D**). Estos resultados sugieren que la expresión de los agregados de GFP-TDP-25 alterarían la formación del axón, en principio, acelerando su desarrollo, pero después causando su colapso del mismo asociado a cúmulos o agregados de NF-H. Sin embargo, es necesario realizar cuantificaciones para definitivamente comprobar este hecho.



Figura

**17. Efecto del agregado TDP-25 en la proteína NF-H (Inmunofluorescencia)** Mediante inmunofluorescencia indirecta se determinó el crecimiento axonal de la línea celular NSC-34-GFP-TDP-25 sometida a privación por nutrientes y estimulada con tetraciclina (+TET) y sin tetraciclina (-TET). Las células fueron tratadas con el anticuerpo anti-neurofilamento subunidad pesada (NF-H)  $\alpha$ -SMI-32 (rojo). Imágenes representativas corresponden a un grupo de (n = 4) Barra de escala 10  $\mu$ m. **(A)** Grupo control NSC-34 en medio de cultivo +TET suplementado con 10 % y 0,5 % de (v/v) de FBS entre 1, 3 y 6 días (1 d, 3 d, 6 d). **(B)** Grupo de células NSC-34-GFP-TDP-25 en medio de cultivo +TET suplementadas con 10 % y 0,5 % de (v/v) de FBS entre 1d, 3d y 6d. **(C)** Grupo de células NSC-34 al tercer día de crecimiento (3 d) en medio de cultivo suplementado con 0,5 % (v/v) de FBS + TET. **(D)** Grupo de células NSC-34-GFP-TDP-25 al sexto día de crecimiento (6 d) en medio de cultivo suplementadas con 0,5 % (v/v) de FBS + TET. Todos los análisis mostrados se hicieron entre 6 h y 6 días de cultivo.

## DISCUSIÓN

La caracterización de la activación de CMA en células NSC-34 mediante privación de nutrientes, evaluado a través de la relocalización subcelular de lisosomas LAMP2A, sugiere que esta línea celular responde a estímulos externos que desencadenan la activación de CMA. Se pudo observar con claridad que en células sometidas a privación de suero (0,5 % y 0 % (v/v) de FBS) los lisosomas LAMP2A se relocalizan alrededor del perinúcleo celular a las 24 h de estímulo (**Figura 10D**). Este tipo de reorganización de lisosomas está asociado a condiciones que activan la CMA (Kaushik & Cuervo, 2019) como la presencia de sustratos para la autofagia mediada por chaperona (Cuervo & Dice, 2000). Sin embargo, cuando se evaluaron los niveles citosólicos de la enzima GAPDH, utilizada comúnmente como sustrato para evaluar la actividad de la CMA (Seki et al., 2012), los mismos se observaron aumentados en las células NSC-34 sometidas a privación de nutrientes (0,5 % y 0 % (v/v) de FBS) (**Figuras 10E y 10F**). Este resultado es contradictorio si se piensa que la actividad de la CMA debería aumentar con la privación de nutrientes. Nuestra hipótesis es que, a pesar de estimularse la localización de los lisosomas LAMP2A en el perinúcleo celular con la privación de nutrientes, la CMA necesita ser inhibida para permitir la diferenciación de las células NSC-34 en estas condiciones. Si bien esto necesita ser comprobado mediante experimentos adicionales que estudien la actividad de CMA más allá de evaluar los niveles citosólicos de GAPDH, algunos resultados que describiremos más adelante apoyarían esta hipótesis. Por otro lado, aunque el mecanismo de esta inhibición queda por ser estudiado, una variación de los niveles proteicos y del estado de oligomerización de LAMP2A en la membrana lisosomal podrían estar regulando esta inhibición (Kaushik & Cuervo, 2019).

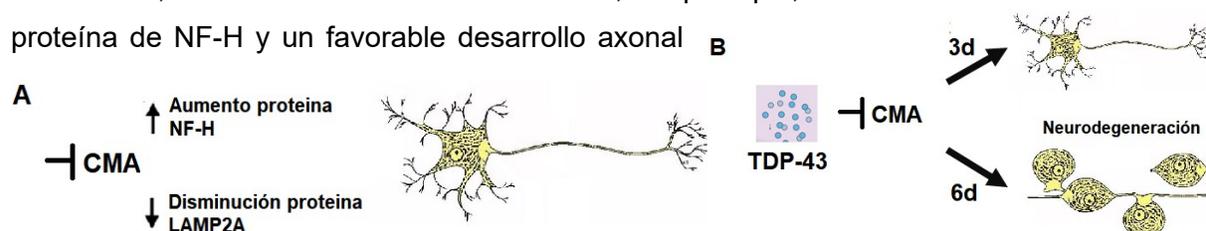
Por medio de la técnica inmunofluorescencia indirecta se pudo observar el cambio de morfología donde las células NSC-34 se diferencian desde un fenotipo redondeado a uno

altamente elongado e interconectado (**Figura 11C**). En condiciones de diferenciación se observaron dos poblaciones celulares principales, diferenciadas por su apariencia morfológica donde una corresponde a células indiferenciadas con axones cortos (color rojo) o inexistentes y otra población de células diferenciadas que se distinguen por desarrollo de grandes axones interconectados (color rojo). Estos resultados concuerdan con trabajos publicados donde se describe que este tipo de morfología se caracteriza por el crecimiento de neuritas y plasticidad dendrítica, así como también, de cambios funcionales como formación de sinapsis y homeostasis de neurotransmisores (Skene et al., 1986). Estos procesos dependen de la expresión de distintas proteínas relacionadas con neurofilamentos y microtúbulos (Skene et al., 1986).

Al caracterizar la actividad de CMA durante el proceso de diferenciación de las células NSC-34, en particular su relación con el crecimiento axonal se pudo observar que aquellas células redondeadas e indiferenciadas poseían mayor localización perinuclear de lisosomas LAMP2A (**Figura 12A**), indicativo de una mayor actividad CMA. Sin embargo, en aquellas células que extendieron axones, la localización perinuclear de lisosomas LAMP2A fue menor, distribuyéndose los mismos en todo el soma neuronal y a lo largo del axón. Esto último apoya el hecho de que CMA podría estar siendo inhibida en células NSC-34 en proceso de diferenciación. Aunque experimentos adicionales son necesarios para apoyar esta idea, nosotros razonamos que, si la CMA es inhibida para favorecer el proceso de diferenciación y el crecimiento de los axones, entonces la diferenciación debería ser favorecida en células con baja actividad CMA. Esto último quedó evidenciado en células NSC-34 con baja actividad CMA mediante el knock-down de LAMP2A (**Figura 14D**), las cuales desarrollaron axones a tiempos más tempranos que las células control, inclusive en condiciones de no diferenciación (**Figura 14B**). Asumiendo que la actividad de CMA podría estar inhibida en células NSC-34 en estado de diferenciación, y que el desarrollo de axones se asocia a múltiples eventos como incremento de proteínas de neurofilamento, maquinaria de neurotransmisores de tipo específica, extensión de la neurita y desarrollo de estructuras sinápticas (Maier et al., 2013), nos preguntamos si algunas de las proteínas relacionadas con el desarrollo axonal podrían ser sustratos de CMA. Una búsqueda bioinformática arrojó que, justamente, la subunidad de neurofilamento NF-H posee dominios KFERQ, transformándolo en un putativo sustrato de CMA (**Tabla 6**). Apoyando esta idea, se observó que lisosomas LAMP2A positivos colocalizan fuertemente con NF-H en células no diferenciadas, pero no así en células con axones desarrollados (**Figura 12B**). Adicionalmente, los niveles proteicos de NF-H aumentaron en células NSC-34 con knock-down para LAMP2A (**Figura 16A y 16B**) sugiriendo fuertemente que esta proteína es sustrato de CMA en un estado no diferenciado.

Algunos antecedentes han demostrado que agregados proteicos pueden inhibir la CMA y alterar la degradación de otras proteínas sustrato para esta vía. En el caso de TDP-43, agregada en ALS, estudios recientes de nuestro laboratorio han demostrado que agregados de esta proteína alteran la actividad de CMA (Ormeño et al., 2020). Para determinar si existe un efecto de los agregados de TDP-43 sobre CMA y sobre el desarrollo axonal de células NSC-34, utilizamos una línea celular NSC-34-GFP-TDP-25 que expresa agregados de 25 kDa de la porción C-terminal de TDP-43 fusionado a la proteína GFP. Cabe destacar que estos agregados de 25 kDa son observados comúnmente en pacientes de ALS (Kitamura et al., 2017). De forma interesante, pudimos observar que los niveles proteicos de la enzima GAPDH están aumentados en esta línea celular que expresa los agregados de 25 kDa, sugiriendo que CMA estaría inhibida (**Figura 15B**). Reforzando esta idea, y considerando a NF-H como un sustrato de CMA, los niveles de esta subunidad de neurofilamento también estuvieron elevados con la expresión de los agregados de 25 kDa (**Figura 16B**). En conjunto, estos resultados indican que la CMA se ve inhibida en condiciones fisiológicas por la sola presencia de los agregados citoplasmáticos de TDP-25 en células NSC-34. Los resultados anteriormente descritos apuntan a una inhibición de CMA en células NSC-34 que expresa los agregados de 25 kDa de TDP-43. De ser así, y considerando la hipótesis de que la CMA es inhibida en células NSC-34 que extienden axones, pudimos observar que las células que expresan el agregado de TDP-25 desarrollaron un mayor número de prolongaciones en tiempos menores a las células control (**Figura 17B**). Sin embargo, este efecto fue parcial, observándose un colapso de las prolongaciones a tiempos largos de diferenciación que coincidió con un acúmulo (o agregación) de la proteína NF-H (**Figura 17B**). La explicación para estos resultados podría ser que, en un principio, la CMA está inhibida por los agregados permitiendo una mayor acumulación de neurofilamento NF-H que favorece un mayor y temprano desarrollo de axones. Sin embargo, a medida que el tiempo pasa, el NF-H se acumula y se agrega, ocasionando el colapso del axón. Es importante destacar que, agregados de las subunidades de neurofilamentos, en especial de NF-H, son una característica común de pacientes de ALS (Brettschneider et al., 2006).

En resumen, nuestros resultados sugieren que en condiciones fisiológicas una inhibición de la CMA es necesaria para el desarrollo axonal de las células NSC-34, posiblemente, a través de la regulación de los niveles proteicos de la subunidad de neurofilamento NF-H (**Figura 18A**). Por otra parte, en condiciones patológicas de agregados de TDP-43, CMA sería inhibida ocasionando, en principio, un aumento en los niveles de proteína de NF-H y un favorable desarrollo axonal



(al menos fenotípicamente). Sin embargo, una excesiva inhibición de CMA causaría la agregación de NF-H, conduciendo al colapso de los axones (**Figura 18B**). Aunque, algunos experimentos adicionales son necesarios para confirmar estas hipótesis, el desarrollo de esta tesis ha dado luces del rol que podría tener CMA en la homeostasis axonal de motoneuronas y su implicancia en enfermedades neurodegenerativas como la ALS.

**Figura 18. Figura resumen. (A)** Efecto de la inhibición de la CMA en el crecimiento axonal. **(B)** Efecto de los agregados de TDP-43 en el crecimiento axonal.

## **CONCLUSIÓN**

Los resultados obtenidos en esta memoria de título permiten concluir lo siguiente:

- En condiciones fisiológicas, CMA sería inhibida para permitir el desarrollo del axón en el modelo de motoneuronas NSC-34.

- CMA regularía el desarrollo del axón en el modelo de motoneuronas NSC-34, en parte, controlando los niveles proteicos de la subunidad de neurofilamento NF-H.

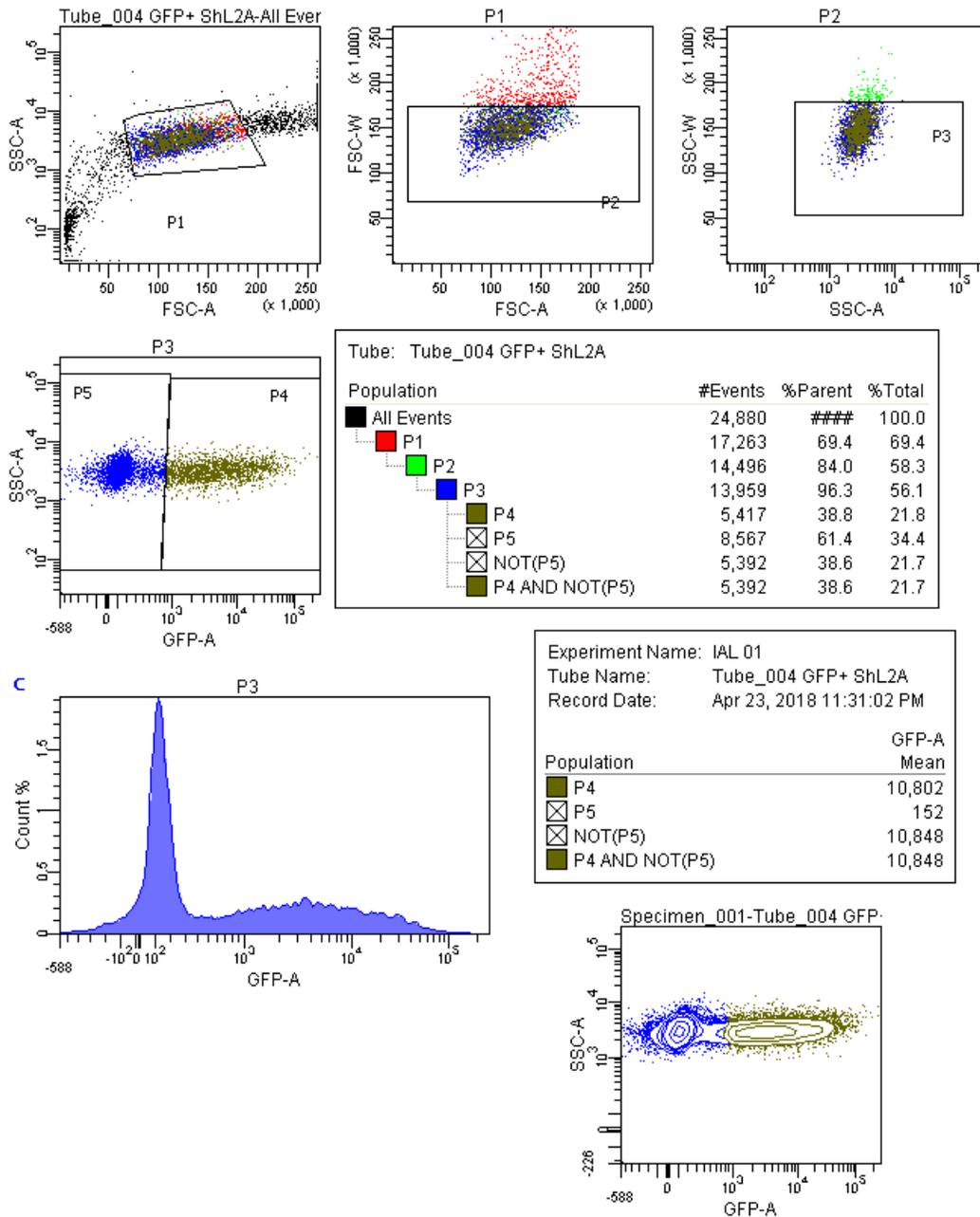
- Agregados de 25 kDa del C-terminal de TDP-43 inhibirían CMA en el modelo celular de motoneuronas NSC-34.

- La inhibición de CMA mediante agregados de 25 kDa del C-terminal de TDP-43 en el modelo celular de motoneuronas NSC-34 provoca un incremento en los niveles de la proteína NF-H lo que culminaría con una alteración del desarrollo axonal a largo plazo.



### 33. FIGURAS SUPLEMENTARIAS

Figura 1 y 2 Parámetros de separación y selección de células transducidas y marcadas con GFP



## BIBLIOGRAFÍA

- Afroz, T., Hock, E. M., Ernst, P., Foglieni, C., Jambeau, M., Gilhespy, L. A. B., ... Polymenidou, M. (2017). Functional and dynamic polymerization of the ALS-linked protein TDP-43 antagonizes its pathologic aggregation. *Nature Communications*, 8(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00062-0>
- Andersen, P. M., & Al-Chalabi, A. (2011). Clinical genetics of amyotrophic lateral sclerosis: What do we really know? *Nature Reviews Neurology*, 7(11), 603–615. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2011.150>
- Bandyopadhyay, U., Kaushik, S., Varticovski, L., & Cuervo, A. M. (2008). The Chaperone-Mediated Autophagy Receptor Organizes in Dynamic Protein Complexes at the Lysosomal Membrane. *Molecular and Cellular Biology*, 28(18), 5747–5763. <https://doi.org/10.1128/MCB.02070-07>
- Beckman, J., Carson, M., Smith, C., & Koppenol, W. (1993). ALS, SOD, and Peroxynitrite (Beckman). *Nature*, vol. 364, 12 august 1993. pdf. <https://doi.org/10.1038/364584a0>
- Brettschneider, J., Petzold, A., Süßmuth, S. D., Ludolph, A. C., & Tumani, H. (2006). Axonal damage markers in cerebrospinal fluid are increased in ALS. *Neurology*, 66(6), 852–856. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000203120.85850.54>
- Brown, R. H., & Al-Chalabi, A. (2017). Amyotrophic Lateral Sclerosis. *New England Journal of Medicine*, 377(2), 162–172. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1603471>
- Budini, M., Romano, V., Avendaño-Vázquez, S. E., Bembich, S., Buratti, E., & Baralle, F. E. (2012). Role of selected mutations in the Q/N rich region of TDP-43 in EGFP-12xQ/N-induced aggregate formation. *Brain Research*, 1462, 139–150. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.02.031>
- Budini, M., Baralle, F. E., & Buratti, E. (2014). Targeting TDP-43 in neurodegenerative diseases. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 18(6), 617–632. <https://doi.org/10.1517/14728222.2014.896905>
- Budini, M., Romano, V., Quadri, Z., Buratti, E., & Baralle, F. E. (2015). TDP-43 loss of cellular function through aggregation requires additional structural determinants beyond its C-terminal Q/N prion-like domain. *Human Molecular Genetics*, 24(1), 9–20. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu415>
- Budini, M., Buratti, E., Morselli, E., & Criollo, A. (2017). Autophagy and Its Impact on Neurodegenerative Diseases: New Roles for TDP-43 and C9orf72. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10(May), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00170>
- Buratti, E. (2008). Multiple roles of TDP-43 in gene expression, splicing regulation, and human disease. *Frontiers in Bioscience*, 13(13), 867. <https://doi.org/10.2741/2727>
- Chiang, H. L., Terlecky, S. R., Plant, C. P., & Dice, J. F. (1989). A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. *Science*, 246(4928), 382–385. <https://doi.org/10.1126/science.2799391>

- Chió, A. (2005). Mortality trends in ALS: an increasingly intricate puzzle. *The Lancet Neurology*, 4(8), 453–454. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(05\)70125-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(05)70125-3)
- Clagett-Dame, M., McNeill, E. M., & Muley, P. D. (2006). Role of all-trans retinoic acid in neurite outgrowth and axonal elongation. *Journal of Neurobiology*, 66(7), 739–756. <https://doi.org/10.1002/neu.20241>
- Colombrita, C., Onesto, E., Megiorni, F., Pizzuti, A., Baralle, F. E., Buratti, E., ... Ratti, A. (2012). TDP-43 and FUS RNA-binding Proteins Bind Distinct Sets of Cytoplasmic Messenger RNAs and Differently Regulate Their Post-transcriptional Fate in Motoneuron-like Cells. *J Biol Chem* 2012 May 4: 15635–15647., 287(19), 15635–15647. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.333450>
- Corbo, M., & Hays, A. P. (1992). Peripherin and Neurofilament Protein Coexist in Spinal Spheroids of Motor Neuron Disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 51(5), 531–537. <https://doi.org/10.1097/00005072-199209000-00008>
- Cuervo, A. M., & Dice, J. F. (1998). Lysosomes, a meeting point of proteins, chaperones, and proteases. *Journal of Molecular Medicine*, 76(1), 6–12. <https://doi.org/10.1007/s001090050185>
- Cuervo, A. M., & Dice, J. F. (2000). Age-related decline in chaperone-mediated autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, 275(40), 31505–31513. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002102200>
- Cuervo, A. M., & Dice, J. F. (2000). Regulation of Lamp2a levels in the lysosomal membrane. *Traffic*, 1(7), 570–583. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2000.010707.x>
- Cuervo, A. M. (2004). Autophagy: Many paths to the same end. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 263(1), 55–72. <https://doi.org/10.1023/B:MCBI.0000041848.57020.57>
- Cuervo, A. M. (2004). Autophagy: Many paths to the same end. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 263(1), 55–72. <https://doi.org/10.1023/B:MCBI.0000041848.57020.57>
- Cuervo, A. M., & Wong, E. (2014). Chaperone-mediated autophagy: Roles in disease and aging. *Cell Research*, 24(1), 92–104. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.153>
- Dagleish, T., Williams, J. M. G.va, Golden, A.-M. J., Perkins, N., Barrett, L. F., Barnard, P. J., ... Watkins, E. (1994). Neurofilament Light and Polyadenylated mRNA Levels Are Decreased in Amyotrophic Lateral Sclerosis Motor Neurons. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 53(3), 221–230.
- Dice, F. (1990). Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Science Trends Biochem Sci.*, 305–309.
- Dugger, B. N., & Dickson, D. W. (2017). Pathology of Neurodegenerative Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 1–22. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028035>.
- Esquerda, joseph E. (2005). Esclerosis lateral amiotrófica. *Mente y Cerebro*, 1, 2–11.

Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., ... Mizushima, N. (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*, 441(7095), 885–889. <https://doi.org/10.1038/nature04724>

Hu, W. T., Josephs, K. A., Knopman, D. S., Boeve, F., Dickson, D. W., Petersen, R. C., & Joseph, E. (2008). Inclusions in Alzheimer Disease. *Acta Neuropathol*, 116(2), 215–220. <https://doi.org/10.1007/s00401-008-0400-4>

INFORME DE EVALUACIÓN CIENTÍFICA BASADA EN LA EVIDENCIA DISPONIBLE  
Condición de Salud: Esclerosis Lateral Amiotrófica Tecnología Sanitaria Evaluada:  
Apoyo profesional, ayudas técnicas y alimentación entera Sistema de Protección  
Financiera para Diagnósticos y Tratamientos de Alto Costo. Ley N° 20.850. “Ley Ricarte  
Soto”.

Jolla, L. (2004). Quantification strategies in real-time PCR Michael W. Pfaffl, 87–112.

Katz, J. S., Dimachkie, M. M., & Barohn, R. J. (2015). Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Historical Perspective. *Neurologic Clinics of NA*, 33(4), 727–734. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2015.07.013>

Kaur, S. J., McKeown, S. R., & Rashid, S. (2016). Mutant SOD1 mediated pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Gene*, 577(2), 109–118. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.11.049>

Kaushik., S., & Cuervo, A. M. (2009). Methods to monitor chaperone-mediated autophagy. *Methods Enzymol* 6879(08), 297–324. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(08\)03619-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(08)03619-7).

Kaushik, S., & Cuervo, A. M. (2019). *The coming of age of chaperone-mediated autophagy* *Methods Enzymol* (Vol. 19). <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0001-6>.The

Kitamura, A., Yuno, S., Muto, H., & Kinjo, M. (2017). Different aggregation states of a nuclear localization signal-tagged 25-kDa C-terminal fragment of TAR RNA/DNA-binding protein 43 kDa. *Genes to Cells*, 22(6), 521–534. <https://doi.org/10.1111/gtc.12495>

Koga, H., & Cuervo, A. M. (2011). Chaperone-mediated autophagy dysfunction in the pathogenesis of neurodegeneration. *Neurobiology of Disease*, 43(1), 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2010.07.006>

Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J. I., Tanida, I., ... Tanaka, K. (2006). Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*, 441(7095), 880–884. <https://doi.org/10.1038/nature04723>

Kovacs, G. G. (2017). *Concepts and classification of neurodegenerative diseases*. *Neuropathology* (1st ed., Vol. 145). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802395-2.00021-3>

Lane, C. A., Hardy, J., & Schott, J. (2018). Alzheimer' s disease. *European Journal of Neurology*, 25, 59–70. <https://doi.org/10.1111/ene.13439>

- Lebouvier, T., Pasquier, F., & Bue, L. (2017). Update on tauopathies. *Current Opinion Neurology*, 30, 1–10. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000502>
- Lee, E. B., Lee, V. M. Y., & Trojanowski, J. Q. (2012). Gains or losses: Molecular mechanisms of TDP43-mediated neurodegeneration. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(1), 38–50. <https://doi.org/10.1038/nrn3121>
- Li, W., Zhu, J., Dou, J., She, H., Tao, K., Xu, H., ... Mao, Z. (2017). Phosphorylation of LAMP2A by p38 MAPK couples ER stress to chaperone-mediated autophagy. *Nature Communications*, 8(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01609-x>
- Lillo, P., Matamala, J. M., Valenzuela, D., & Verdugo, R. (2014). Overlapping features of frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis. *Rev. Med. Chil.* 43, 867–879.
- Mackenzie, I. R., Rademakers, R., & Neumann, M. (2010). TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Lancet Neurol*, 9(10), 995–1007. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70195-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70195-2)
- Maier, O., Böhm, J., Dahm, M., Brück, S., Beyer, C., & Johann, S. (2013). Differentiated NSC-34 motoneuron-like cells as experimental model for cholinergic neurodegeneration. *Neurochemistry International*, 62(8), 1029–1038. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2013.03.008>
- Mizushima, N. (2004). Methods for monitoring autophagy. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 36(12), 2491–2502. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.02.005>
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A. M., & Klionsky, D. J. (2009). NIH Public Access, 451(7182), 1069–1075. <https://doi.org/10.1038/nature06639>. Autophagy
- Neumann, M., Sampathu, D. M., Kwong, L. K., Truax, A. C., Micsenyi, M. C., Chou, T. T Lee, V. M.-Y. (2006). Ubiquitinated TDP-43 in Frontotemporal Lobar Degeneration and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Science*, 314(5796), 130–133. <https://doi.org/10.1126/science.1134108>
- Oberstadt, M., Claßen, J., Arendt, T., & Holzer, M. (2018). TDP-43 and Cytoskeletal Proteins in ALS. *Molecular Neurobiology*, 55(4), 3143–3151. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0543-1>
- Oku, M., & Sakai, Y. (2018). Three Distinct Types of Microautophagy Based on Membrane Dynamics and Molecular Machineries. *BioEssays*, 40(6), 1–6. <https://doi.org/10.1002/bies.201800008>
- Opara, J. A., Malecki, A., Malecka, E., & Socha, T. (2017). Motor assessment in Parkinson `s disease. *Ann Agric Environ Med* 24(3), 411–415. <https://doi.org/10.5604/12321966.1232774>
- Orient, F., Terré, R., Guevara, D., & Bernabeu, M. (2006). Tratamiento neurorrehabilitador de la esclerosis lateral amiotrófica. *Revista de Neurología*, 43(9), 549–555. Retrieved from <http://www.neurologia.com/pdf/Web/4309/w090549.pdf>

- Ormeño, F., Hormazabal, J., Moreno, J., Riquelme, F., Rios, J., Criollo, A., ... Budini, M. (2020). Chaperone Mediated Autophagy Degrades TDP-43 Protein and Is Affected by TDP-43 Aggregation. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 13(February), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.00019>
- Ottolini, D., Cali, T., Ildiko, S., & Brini, M. (2016). Alpha-synuclein at the intracellular and the extracellular side: functional and dysfunctional implications. *Biological Chemistry*, 398(1), 77–100. <https://doi.org/10.1515/hsz-2016-0201>
- Ou, S. H., Wu, F., Harrich, D., Garcia-Martinez, L. F., Gaynor, R. B., García-Martínez, L. F., & Gaynor, R. B. (1995). Cloning and characterization of a novel cellular protein, TDP-43, that binds to human immunodeficiency virus type 1 TAR DNA sequence motifs. *Journal of Virology*, 69(6), 3584–3596. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp303>
- Patel, B., & Cuervo, A. M. (2015). Methods to study chaperone-mediated autophagy. *Methods*, 75, 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.01.003>
- Sabitha, K. R., Sanjay, D., Savita, B., Raju, T. R., & Laxmi, T. R. (2016). Electrophysiological characterization of Nsc-34 cell line using Microelectrode Array. *Journal of the Neurological Sciences*, 370, 134–139. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2016.09.038>
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- Segura, T., & Galindo, M. F. (2003). Dianas farmacológicas en las enfermedades neurodegenerativas. *Revisiones de Neurociencia*, 36(11), 1047–1057.
- Seki, T., Yoshino, K. ich, Tanaka, S., Dohi, E., Onji, T., Yamamoto, K., ... Sakai, N. (2012). Establishment of a novel fluorescence-based method to evaluate chaperone-mediated autophagy in a single neuron. *PLoS ONE*, 7(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031232>
- Skene, J. H. P., Jacobson, R. D., Snipes, G. J., McGuire, C. B., Norden, J. J., & Freeman, J. A. (1986). A protein induced during nerve growth (GAP-43) is a major component of growth-cone membranes. *Science*, 233(4765), 783–786. <https://doi.org/10.1126/science.3738509>
- Taylor, J. P., Brown, R. H., & Cleveland, D. W. (2016). Decoding ALS: From genes to mechanism. *Nature*, 539(7628), 197–206. <https://doi.org/10.1038/nature20413>
- Tooze, S. A., & Dikic, I. (2016). Autophagy Captures the Nobel Prize. *Cell*, 167(6), 1433–1435. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.023>
- Tripathi, V. B., Baskaran, P., Shaw, C. E., & Guthrie, S. (2014). Tar DNA-binding protein-43 (TDP-43) regulates axon growth in vitro and in vivo. *Neurobiology of Disease*, 65, 25–34. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.01.004>
- Volkening, K., Leystra-Lantz, C., Yang, W., Jaffee, H., & Strong, M. J. (2009). Tar DNA binding protein of 43 kDa (TDP-43), 14-3-3 proteins and copper/zinc superoxide dismutase (SOD1) interact to modulate NFL mRNA stability. Implications for altered

- RNA processing in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Brain Research*, 1305, 168–182. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.09.105>
- Vucic, S., Rothstein, J. D., & Kiernan, M. C. (2014). Advances in treating amyotrophic lateral sclerosis: Insights from pathophysiological studies. *Trends in Neurosciences*, 37(8), 433–442. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.05.006>
- Wang, X., Fan, H., Ying, Z., Li, B., Wang, H., & Wang, G. (2010). Degradation of TDP-43 and its pathogenic form by autophagy and the ubiquitin-proteasome system. *Neuroscience Letters*, 469(1), 112–116. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.11.055>
- Wang, D. W., Peng, Z. J., Ren, G. F., & Wang, G. X. (2015). The different roles of selective autophagic protein degradation in mammalian cells. *Oncotarget*, 6(35), 37098–37116. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5776>
- Williamson, T. L., Bruijn, L. I., Zhu, Q., Anderson, K. L., Anderson, S. D., Julien, J. P., & Cleveland, D. W. (1998). Absence of neurofilaments reduces the selective vulnerability of motor neurons and slows disease caused by a familial amyotrophic lateral sclerosis-linked superoxide dismutase 1 mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(16), 9631–9636. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.16.9631>
- Wong, E., & Cuervo, A. M. (2010). Autophagy gone awry in neurodegenerative diseases. *Nat Neurosci.*, 8(24), 4017–4018. <https://doi.org/10.1002/bmb.20244.DNA>
- Xilouri, M., & Stefanis, L. (2015). Chaperone mediated autophagy to the rescue: A new-fangled target for the treatment of neurodegenerative diseases. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 66(PA), 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2015.01.003>
- Yuan, A., Rao, M. V, & Nixon, R. A. (2017). Neurofilaments and Neurofilament Proteins in Health and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017 Apr 3;9(4): a018309. doi: 10.1101/cshperspect.a018309.
- Zetterberg, H., Skillbäck, T., Mattsson, N., Trojanowski, J. Q., Portelius, E., Shaw, L. M., Blennow, K. (2016). Association of cerebrospinal fluid neurofilament light concentration with Alzheimer disease progression. *JAMA Neurology*, 73(1), 60–67. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2015.3037>