Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Déficits conductuales y neurodegeneración en ratones transgénicos para la proteína TDP-43: implicancias para la Demencia Frontotemporal y la Esclerosis Lateral Amiotófrica

Alfieri, Julio Armando

2017-04-28

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Alfieri, Julio Armando. (2017-04-28). Déficits conductuales y neurodegeneración en ratones transgénicos para la proteína TDP-43: implicancias para la Demencia Frontotemporal y la Esclerosis Lateral Amiotófrica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Alfieri, Julio Armando. "Déficits conductuales y neurodegeneración en ratones transgénicos para la proteína TDP-43: implicancias para la Demencia Frontotemporal y la Esclerosis Lateral Amiotófrica". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2017-04-28.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Déficits conductuales y neurodegeneración en ratones transgénicos para la proteína TDP-43: implicancias para la Demencia Frontotemporal y la Esclerosis Lateral Amiotrófica

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Julio Armando Alfieri

Director de Tesis: Dr. Lionel Muller Igaz

Consejero de Estudios: Dr. Arturo Romano

Laboratorio de Fisiopatología Neuronal, Grupo de Neurociencia de Sistemas, IFIBIO Houssay, Facultad de Medicina, UBA

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina, 2017

Resumen

Déficits conductuales y neurodegeneración en ratones transgénicos para la proteína TDP-43: implicancias para la Demencia Frontotemporal y la Esclerosis Lateral Amiotrófica

Las enfermedades neurodegenerativas son la principal causa de discapacidad y muerte prematura en personas mayores a nivel mundial. Diversas patologías neurodegenerativas presentan inclusiones insolubles compuestas principalmente por la proteína TDP-43 (Transactive response DNA-binding Protein 43). Esta proteína fue identificada como el componente predominante de los agregados citoplasmáticos observados en la mayoría de los casos de esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y en aproximadamente la mitad de los casos de demencia frontotemporal (DFT-TDP). Estos y otros desórdenes neurodegenerativos con presencia de agregados de TDP-43 se conocen actualmente como "proteinopatías de TDP-43".

Recientemente, se ha generado y caracterizado un novedoso modelo de ratones transgénicos para TDP-43 con expresión regulable dirigida a neuronas del cerebro anterior, utilizando el promotor CaMKIIα acoplado a un sistema tTA (controlado por tetraciclina), modelo empleado en el presente trabajo. Estos ratones expresan una variante de localización citoplasmática de la proteína (TDP-43-ΔNLS) y recapitulan una serie de características neuropatológicas de las proteinopatías de TDP-43, incluyendo neurodegeneración selectiva, gliosis, degeneración del tracto corticoespinal, inclusiones citoplasmáticas de TDP-43, disminución de la expresión nuclear normal de TDP-43 endógeno y cambios globales de la expresión génica. Sin embargo, la contribución específica de la expresión de TDP-43-ΔNLS a nivel conductual no ha sido evaluada en profundidad.

En el presente trabajo de tesis doctoral, se buscó realizar una caracterización conductual detallada y una evaluación de la neurodegeneración en estos ratones. Para lograr este objetivo, se llevó a cabo una batería de tests conductuales para evaluar fenotipos motores, cognitivos y sociales, y se estudió la pérdida neuronal a diferentes tiempos luego de la inducción del transgén. Se observó que los ratones transgénicos TDP-43-ΔNLS con 1 mes de inducción presentan una performance motora alterada, incluyendo hiperlocomoción espontánea en el test de campo abierto, pérdida del balance y coordinación en el rotarod, y un alto grado de espasticidad medido por el fenotipo de clasping. El análisis cognitivo reveló alteraciones en las memorias de reconocimiento, espacial y aversiva, medidas por el test de reconocimiento de objeto novedoso, laberinto en forma de "Y" y evitación inhibitoria pasiva, respectivamente.

Más aún, los ratones TDP-43-ΔNLS presentaron déficits en conductas sociales, un aspecto clave de la DFT.

Con el fin de analizar si estos síntomas son reversibles, se suprimió la expresión del transgén por 14 días en ratones de 1,5 meses de edad (0,5 meses de inducción del transgén), los cuales ya presentan un fenotipo conductual anormal pero una neurodegeneración leve, y se observó una reversión de los déficits motores y cognitivos. Sin embargo, la performance social permaneció alterada. Cuando se suprimió la expresión del transgén en ratones adultos de 6,5 meses de edad (5,5 meses de inducción del transgén), los cuales muestran una neurodegeneración evidente, los déficits motores resultaron irreversibles.

Finalmente, para comprender las bases moleculares y celulares del efecto de la sobre-expresión de TDP-43-ΔNLS en las alteraciones conductuales, incluyendo las funciones cognitivas, se analizó el patrón de expresión y activación de genes relacionados con fenómenos de actividad y plasticidad sináptica (Zif268, c-Fos, Arc). El análisis por inmunofluorescencia de diferentes regiones cerebrales (involucradas en el procesamiento de las conductas alteradas en estos ratones) reveló una profunda disminución de la expresión de estos genes en los animales transgénicos. Debido a que dichos genes son regulados positivamente luego de una tarea conductual y son necesarios para el procesamiento cognitivo, también se evaluó su respuesta luego de exponer a los ratones a una sesión en el test de campo abierto. Los animales transgénicos TDP-43-ΔNLS mostraron una reducida o ausente inducción de Zif268, c-Fos y Arc en la corteza e hipocampo.

En conjunto, los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que los ratones TDP-43-ΔNLS presentan diversos déficits conductuales característicos de DFT con enfermedad de motoneurona. Adicionalmente, estos resultados sugieren que la alteración conductual mediada por TDP-43 está sostenida por cambios funcionales en la población de neuronas afectadas, independientemente de una neurodegeneración extensa, y que distintos síntomas podrían tener diferentes grados de susceptibilidad a la mejora. Además, la reducción en la expresión e inducción de los genes tempranos inmediatos Zif268, c-Fos y Arc sugiere un novedoso mecanismo mediado por TDP-43 que sustentaría las conductas alteradas evidenciadas en los ratones TDP-43 y, potencialmente, en las proteinopatías de TDP-43.

Palabras clave: Fenotipos conductuales; demencia frontotemporal; TDP-43; neurodegeneración; proteinopatías; animales transgénicos.

Abstract

Behavioral deficits and neurodegeneration in TDP-43 transgenic mice: implications for frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis

Neurodegenerative diseases are a major cause of disability and premature death among older people worldwide. Several neurodegenerative diseases display inclusions mainly composed of insoluble TDP-43 (Transactive response DNA-binding Protein 43), and this protein was identified as the main component of the distinctive cytoplasmic aggregates seen in the vast majority of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) cases and about half of the cases of frontotemporal dementia (FTLD-TDP). These and other neurodegenerative disorders with the presence of aggregated TDP-43 are now collectively referred to as “TDP-43 proteinopathies”.

A transgenic TDP-43 mouse model with inducible, forebrain-enriched neuronal expression using a CaMKIIα promoter coupled to a tTA system has been recently developed and characterized, and this is the model used in the present work. These mice express a cytoplasmic form of the protein (TDP-43-ΔNLS), and they recapitulate several aspects of TDP-43 proteinopathies, including time-dependent neuronal loss, gliosis, corticospinal tract degeneration, TDP-43 cytoplasmic inclusions (rare), loss of normal nuclear TDP-43 (endogenous) expression and global changes in gene expression. However, the specific contribution of TDP-43-ΔNLS expression at the behavioral level was not previously investigated.

In this work, we sought to perform both a detailed behavioral characterization and an assessment of neurodegeneration in these mice. In order to achieve this, we performed a battery of behavioral tests to evaluate motor, cognitive, and social phenotypes and studied neuronal loss at different times of transgene induction in this model. We found that post-weaning 1 month induction of the transgene led to motor abnormalities including hyperlocomotion in the open field test, impaired coordination and balance in the rotarod test, and increased spasticity as shown by a clasping phenotype. Cognitive assessment demonstrated impaired recognition, spatial and aversive memory, measured by novel object recognition, Y-maze and inhibitory avoidance tests, respectively. Remarkably, TDP-43-ΔNLS mice displayed deficits in social behavior, mimicking a key aspect of FTD.

In order to analyze whether these symptoms were reversible, we suppressed transgene expression for 14 days in 1.5-month-old mice (0.5-month of transgene induction) showing an established behavioral phenotype but modest

neurodegeneration and found that motor and cognitive deficits were ameliorated; however, social performance remained altered. When transgene expression was suppressed in 6.5-month-old mice (5.5-month of transgene induction) showing overt neurodegeneration, motor deficits were irreversible.

Finally, to begin to understand the molecular and cellular basis of the effect of the overexpression of TDP-43-ΔNLS on behavioral abnormalities, including cognitive functions, we evaluated changes in plasticity-related pathways, specifically analyzing well-known gene products involved in neural plasticity (Zif268, c-Fos, Arc). Immunofluorescence staining of several brain areas (involved in processing the behavioral tasks impaired in these mice) revealed a profound decrease of all three proteins in transgenic versus control mice. Since these genes are upregulated upon behavioral challenges and are necessary for cognitive processing, we also evaluated their response after exposure to an open field test. TDP-43 transgenic mice display a reduced or absent induction of all three genes in cortical and hippocampal regions.

Taken together, the results obtained in the present work indicate that TDP-43-ΔNLS mice display several core behavioral features of FTD with motor neuron disease. Additionally, these results suggest that TDP-43-mediated behavioral dysfunction is sustained by functional changes in populations of affected neurons independently of extensive neurodegeneration and that diverse symptoms might have different susceptibility to amelioration. Furthermore, the reduced expression and induction of the immediate early genes Zif268, c-Fos and Arc suggests a novel TDP-43 driven mechanism underlying the behavioral abnormalities displayed by TDP-43 mice and potentially in human TDP-43 proteinopathies.

Key words: Behavioral phenotypes; frontotemporal dementia; TDP-43; neurodegeneration; proteinopathies; transgenic mice.

A mis padres Susana y Julio,

a mis hermanos Mano, Caro y Leo,

a Euge,

a mis amigos,

GRACIAS A TODOS

Esta tesis fue realizada, así como mi carrera de grado, en instituciones públicas y financiada por subsidios del Estado argentino. Fui becado por el CONICET durante los 5 años que llevó concretarla para poder ofrecerle dedicación exclusiva.

CONTENIDO

ABREVIATURAS **11**

INTRODUCCIÓN **13**

1. Enfermedades neurodegenerativas 14
   1.1 Mecanismos de agregación y propagación 16
   1.2 Plegamiento proteico y neurodegeneración 16

2. TAR DNA-binding Protein 43 19
   2.1 Fisiología de TDP-43 19

3. Proteinopatías de TDP-43 22
   3.1 Demencia frontotemporal y Esclerosis lateral amiotrófica 22
   3.2 Desórdenes neurodegenerativos con patología de TDP-43 secundaria 24
   3.3 Genética asociada a proteinopatías de TDP-43 25

4. Neuropatología en DFT y ELA 28
   4.1 Modificaciones postraduccionales: Fosforilación – Ubiquitinación – Clivaje 30
   4.2 Agregación 32
   4.3 Pérdida de localización nuclear 33

5. Modelos de Neurodegeneración mediada por TDP-43 34

6. Modelos animales de proteinopatías de TDP-43 35

7. Expresión génica mediada por TDP-43 39

8. Genes tempranos inmediatos 40

OBJETIVOS **43**

Objetivo general: 44

Objetivos específicos: 45

MATERIALES Y MÉTODOS **46**

1. Generación y mantenimiento de los animales transgénicos 47
   1.1 Administración de Doxiciclina (Dox) 48
   1.2 Genotipado 48

2. Protocolo de supresión del transgén 50

3. Estudios Conductuales 50
   3.1 Test de campo abierto 51
   3.2 Rotarod 52
   3.3 Fenotipo de Clasping 53
   3.4 Reconocimiento de objeto novedoso 53
   3.5 Test de evitación inhibitoria pasiva 54
   3.6 Alternancia espontánea en el laberinto en forma de Y 55
   3.7 Test de Interacción Social 56
   3.8 Test de olfato: habituación/deshabituación 58
   3.9 Test de percepción visual 58
   3.10 Test de auto-acicalamiento 60
   3.11 Prueba de agarre 60

4. Preparación del tejido cerebral 61

6. Inmunofluorescencia 62

7. Cuantificación celular y medición de grosor de regiones cerebrales 62

8. Electroforesis SDS-PAGE e Inmunoblot 63

9. Análisis Estadístico 64

RESULTADOS 65

PRIMERA PARTE:
Caracterización Inicial del Modelo: Ratones transgénicos hTDP-43-ΔNLS 66

SEGUNDA PARTE:
La sobreexpresión de hTDP-43-ΔNLS en neuronas del cerebro anterior afecta múltiples dominios conductuales asociados a DFT con enfermedad de motoneurona 71

1. Los ratones transgénicos hTDP-43-ΔNLS desarrollan alteraciones motoras 71
   1.1 Test de Campo Abierto 71
   1.2 Performance en el Rotarod 73
   1.3 Fenotipo de Clasping 74
   1.4 Prueba de Fuerza de Agarre (Hang wire test) 74

2. Déficits cognitivos en ratones hTDP-43-ΔNLS 75
   2.1 Test de reconocimiento de objeto novedoso 76
   2.2 Tarea de alternancia en el laberinto en forma de Y 76
   2.3 Test de evitación inhibitoria 78

3. Ratones hTDP-43-ΔNLS presentan conductas sociales alteradas 80

TERCERA PARTE:
Estudio de la supresión temporaria del transgén en ratones transgénicos jóvenes y adultos 84

1. La supresión temporaria del transgén en ratones jóvenes revierte el fenotipo motor y cognitivo alterado 84
   1.1 Diseño experimental de supresión y análisis de la regulación de expresión del transgén 84
   1.2 La supresión de hTDP-43-ΔNLS revierte el fenotipo motor alterado 86
   1.3 La supresión de la expresión del transgén en ratones jóvenes mejora las conductas cognitivas alteradas pero no así las conductas sociales 88

2. Los ratones hTDP-43-ΔNLS jóvenes presentan una limitada neurodegeneración 90

3. Persistencia de déficits motores en ratones adultos de 6 meses de inducción luego de la supresión del transgén 94
   3.1 Diseño experimental de supresión y análisis de la regulación de expresión del transgén en ratones adultos 94
   3.2 La supresión de hTDP-43-ΔNLS en ratones adultos no revierte el fenotipo motor alterado 95
   3.3 Neurodegeneración en ratones transgénicos de 6 meses de inducción 97

CUARTA PARTE:
Análisis de la expresión y activación de genes relacionados con fenómenos de actividad y plasticidad sináptica 99

1. Disminución de los niveles de expresión basal de los IEGs zif268, c-fos y arc en ratones bigénicos 99

2. Los ratones hTDP-43-ΔNLS presentan una respuesta anormal en la inducción de IEGs 100

DISCUSIÓN 107

REFERENCIAS 116

ABREVIATURAS

1m: 1 mes

3´UTR: Regiones 3' no codificantes

6m: 6 meses

AMC: Autofagia mediada por chaperonas

C9orf72: Marco de lectura 72 del cromosoma 9

Cg: Cíngulo

CM: Corteza motora

CPFm: Corteza prefrontal medial

CSS: Corteza somato sensorial

Ctrol: Grupo control

DFT: Demencia frontotemporal

DFT-EMN: DFT con enfermedad de motoneurona

DFT-Tau: DFT con patología de Tau

DFT-TDP: DFT con patología de TDP-43

DFT-U: DFT con inclusiones ubiquitinadas

Dox: Doxiciclina

DPR: Dipéptidos repetitivos de agregación

EA: Enfermedad de Alzheimer

EH: Enfermedad de Huntington

ELA: Esclerosis lateral amiotrófica

EMN: Enfermedad de motoneurona

EP: Enfermedad de Parkinson

FCT: Fragmento c terminal

FUS: Fused in Sarcoma

GD: Giro dentado

hnRNPs: ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares

ICNs: Inclusiones citoplasmáticas neuronales

IEG: Immediate early gene

IINs: Inclusiones intranucleares neuronales

NDs: Neuritas distróficas

NES: Nuclear Export Signal/ Secuencia de exportación nuclear

NLS: Nuclear localization signal/ Secuencia de localización nuclear

NMD: nonsense-mediated decay

nTg: No transgénico

P28: Día postnatal 28

PPA: Proteína precursora de amiloide

RRM: RNA recognition motif/ Dominio de reconocimiento de ARN

SOD1: Superóxido dismutasa 1

SUP: Sistema ubiquitina-proteasoma

Sup: Suprimido

TARDBP: Transactive response DNA binding Protein 43 (gen)

TDP-43: Transactive response DNA-binding Protein 43

Tg: Transgén

tTA/ΔNLS: Ratones bigénicos, expresan hTDP-43-ΔNLS

tTA: Transactivador de tetraciclina

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. Enfermedades neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas son la principal causa de discapacidad y muerte prematura en personas mayores a nivel mundial. Estas patologías, para las cuales no existen actualmente terapias que modifiquen el curso de la enfermedad, muestran una gran diversidad de fenotipos clínicos. Sin embargo, poseen una característica patológica en común: la acumulación de determinadas proteínas en agregados insolubles dentro o entre ciertas poblaciones neuronales y células gliales [1]. Se pueden clasificar de acuerdo a: 1) el patrón temporal y regional de formación de agregados, 2) las poblaciones celulares afectadas y 3) las proteínas que constituyen los agregados [2]. Cada una de estas características, combinada con la propia respuesta del paciente a los agregados, puede a su vez alterar distintas cascadas de eventos, llevando a un patrón particular de afectación neuronal, que se puede manifestar clínicamente como una demencia en el caso de la enfermedad de Alzheimer o un desorden de la movilidad, como es el caso de la enfermedad de Parkinson.

Por tal motivo, las enfermedades neurodegenerativas, como enfermedad de Alzheimer (EA), Parkinson (EP), Huntington (EH), demencia frontotemporal (DFT) y esclerosis lateral amiotrófica (ELA) presentan diferentes manifestaciones clínicas, pero en todas se involucra la acumulación de proteínas mal plegadas: los agregados fosforilados de la proteína asociada a microtúbulo tau en ovillos neurofibrilares, en conjunto con los depósitos de β-amiloide (Aβ), son característicos en la enfermedad de Alzheimer (EA) *(Figura 1 A y B)*. Los casos donde solo se observa patología tau caracteriza a un subgrupo de casos de demencia frontotemporal (DFT), designados como DFT-tau [3, 4]. Las acumulaciones de α-sinucleína en cuerpos de Lewy y neuritas de Lewy son la firma patológica de la EP, EP con demencia, como así también en demencia con cuerpos de Lewy *(Figura 1 C)* [5]. Incluso, la mayoría de los casos de ELA y otro subgrupo de casos de DFT (DFT-TDP) están caracterizados por los agregados insolubles de la proteína de unión a ADN TAR de 43kD *(Figura 1 D)* (TDP-43, por sus siglas en inglés) [6]. La *Tabla 1* muestra un resumen general de proteínas asociadas a enfermedades neurodegenerativas.

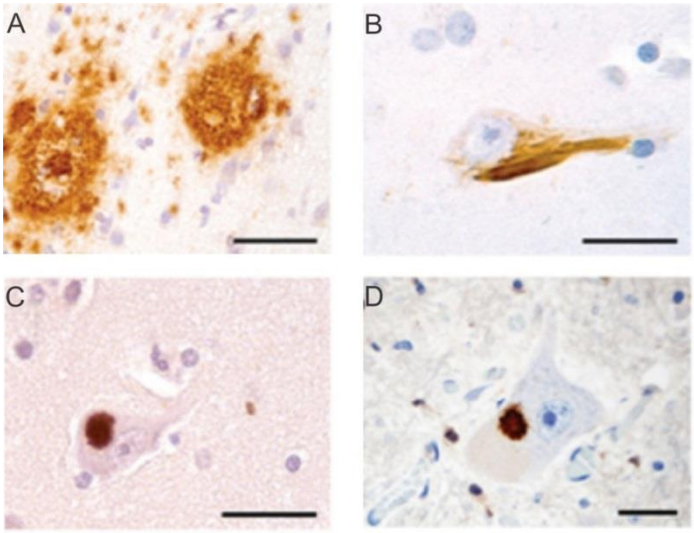

Figura 1: Lesiones por depósitos de proteínas en enfermedades neurodegenerativas.
***A**. Depósitos de β-amiloide en la neocorteza de un paciente con enfermedad de Alzheimer. **B**. Ovillos neurofibrilares Tau positivos en la neocorteza de un paciente con enfermedad de Alzheimer. **C**. Inclusión de α-sinucleína (cuerpo de Lewy) en una neurona neocortical de un paciente con enfermedad de Parkinson/demencia con cuerpos de Lewy. **D**. Inclusión TDP-43 positiva en una motoneurona de médula espinal de un paciente con esclerosis lateral amiotrófica. Escalas 50 µm en A y 20 µm B–D. (Modificado de [7]).*

Proteína Patológica	Enfermedad Asociada	Localización proteica		Lesión microscópica
		Fisiológica	Patológica	
α-sinucleína	Enf. de Parkinson Demencia con cuerpo de Lewy Atrofia Multisistémica	Presináptica	Citoplasmática	Cuerpos de Lewy
β-amiloide	Enf. de Alzheimer	Transmembrana (APP)	Extracelular	Placa Amiloide
Huntingtina (mutada)	Enf. de Huntington	Nuclear	Nuclear	Inclusiones nucleares
Superóxido Dismutasa 1	ELA	Citoplasmática	Citoplasmática	Inclusiones citoplasmáticas
FUS	DFT-FUS ELA	Nuclear	Citoplasmática	Inclusiones Fus positivas
Tau	Enf. de Alzheimer DFT-tau Enf. de Pick Degeneración corticobasal	Citoplasmática	Citoplasmática	Ovillos neurofibrilares Inclusiones Tau Positivas Cuerpos de Pick Inclusiones Tau Positivas
TDP-43	DFT-TDP ELA	Nuclear	Citoplasmática/Nuclear	Inclusiones TDP-43 positivas

Tabla 1: Proteínas comúnmente asociadas a enfermedades neurodegenerativas.
DFT: Demencia Frontotemporal. ELA: Esclerosis Lateral Amiotrófica. (Modificado de [2])

1.1 Mecanismos de agregación y propagación

En estas patologías, los agregados insolubles están compuestos por una variante mal plegada de la proteína (o péptido) normal o “salvaje” (wild type, WT, por sus siglas en inglés). Estas proteínas son modificadas desde su conformación nativa hacia especies fibrilares o multiméricas patológicas y suelen funcionar como semillas o moldes que dirigen la alteración estructural de sus contrapartes no patológicas en un proceso similar a lo observado en las enfermedades priónicas [8]. Estudios recientes sugieren que se generaría una reacción en cadena de alteración conformacional y agregación progresiva de proteínas mal plegadas, logrando incluso una transmisión célula a célula entre neuronas y células gliales vecinas *(Figura 2)* [9, 10].
Aunque estos mecanismos se creían exclusivos de enfermedades priónicas, estudios realizados recientemente en tejido humano, cultivos celulares y modelos animales, demostraron que estos procesos de transmisión por autopropagación se podrían presentar en varias proteínas asociadas con enfermedades neurodegenerativas, incluyendo β-amiloide, Tau, α-sinucleína, huntingtina con expansiones de poliglutamina, SOD1 y TDP-43 fosforilada [7].

1.2 Plegamiento proteico y neurodegeneración

Las proteínas mal plegadas que se generan en distintos compartimentos celulares, incluyendo el citoplasma, núcleo y retículo endoplasmático, son eficientemente removidas por los sistemas de control de calidad. Entre ellos, el sistema ubiquitina-proteasoma (SUP), autofagia mediada por chaperonas (AMC) y macroautofagia *(Figura 3)* [11]. Las proteínas mal plegadas son reconocidas por chaperonas moleculares que derivan los sustratos a SUP, AMC o macroautofagia. Aquellas proteínas mal plegadas solubles son degradadas mediante el sistema SUP, donde los sustratos son marcados con ubiquitina y dirigidos hacia el proteasoma para su degradación. Por otra parte, proteínas mal plegadas que exponen la secuencia señal de degradación KFERQ son reconocidas por la chaperona Hsc70 y llevadas a degradación en los lisosomas por medio de hidrolasas ácidas (AMC). Algunas proteínas mal plegadas que escapan a los sistemas SUP y AMC, o tienden a formar agregados, siguen el camino de degradación por macroautofagia, un sistema de degradación donde los sustratos son secuestrados en autofagosomas para luego fusionarse con lisosomas y llevar a cabo la degradación de los agregados [12]. Si bien la mayoría de las proteínas codificadas por el genoma humano pueden ser eficientemente removidas de la célula cuando se encuentran mal plegadas, algunos

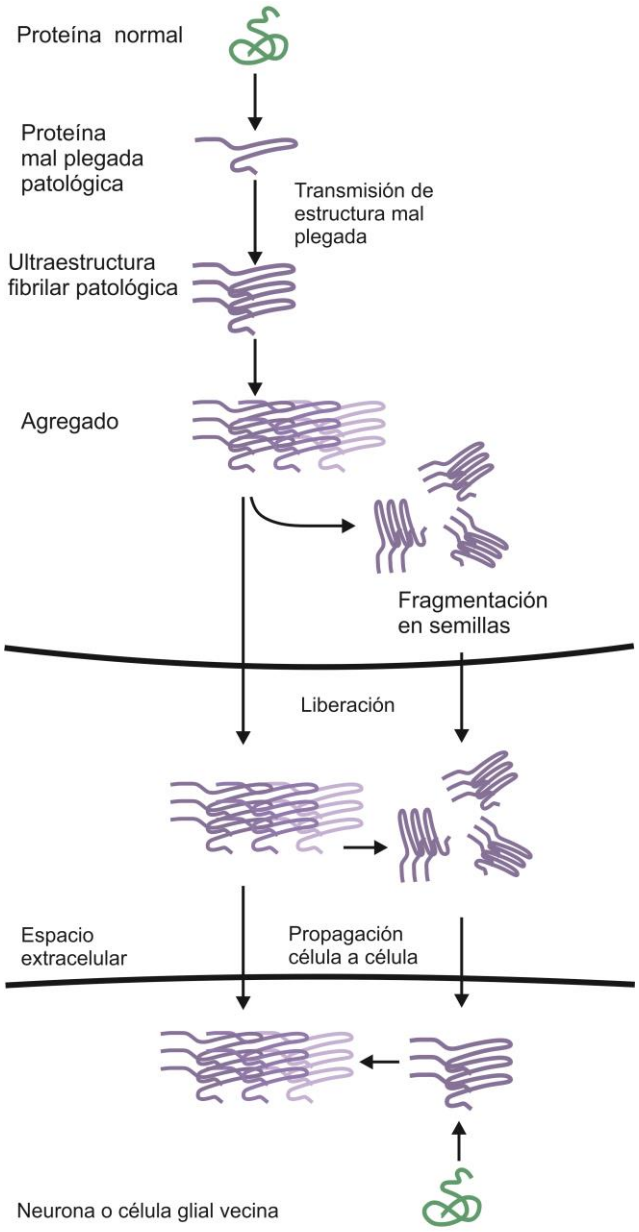

Figura 2. Mecanismo molecular hipotético de la transmisión tipo prion en enfermedades neurodegenerativas.
Las proteínas patológicas asociadas a la enfermedad son transformadas desde su conformación nativa vía intermediarios en especies fibrilares. Estas especies tienen propiedades de amiloides (ultraestructura fibrilar formada por polímeros insolubles que adquieren estructura de lámina-β) y sirven como molde para dirigir la conversión de la proteína desde su versión fisiológica a la forma aberrante patológica. En un proceso de autopropagación, la progresiva conversión y agregación de las proteínas mal plegadas da como resultado la formación de agregados insolubles. Evidencias recientes demuestran que estos agregados patológicos podrían transmitirse a neuronas interconectadas y células gliales adyacentes (Adaptado de [1]).

polipéptidos generados por: a) modificaciones postraduccionales (por ejemplo, tau hiperfosforilada o β-amiloide por clivaje proteolítico en EA) o b) mutaciones genéticas en proteínas específicas (como huntingtina en EH, α-sinucleína en EP, TDP-43 en

provee un mecanismo celular subyacente a la patogenia en muchas enfermedades neurodegenerativas [13].

En 2006, se produjo un profundo avance en el campo de las enfermedades neurodegenerativas, debido a la identificación de la proteína TAR DNA-binding Protein 43 (TDP-43) como el componente primario de las inclusiones intracelulares ubiquitinadas en la mayoría de los casos de Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) y Demencia Frontotemporal (DFT) [6], dos procesos neurodegenerativos que actualmente no tienen cura conocida. Aunque previamente considerada una proteína prácticamente desconocida, este hallazgo catapultó a TDP-43 al primer plano y desencadenó una avalancha de actividad de investigación cuyo objetivo fue definir el alcance de la patología de TDP-43 en las enfermedades neurodegenerativas y entender el posible rol neurotóxico de TDP-43. La posterior ampliación del espectro de trastornos neurodegenerativos que presentan agregados de TDP-43 ha subrayado la importancia de dedicar grandes esfuerzos para desentrañar las causas que subyacen a este grupo de enfermedades, las proteinopatías de TDP-43.

2. TAR DNA-binding Protein 43

TDP-43 es una proteína de 414 aminoácidos (43 KDa) codificada por el gen *Tardbp* en el cromosoma 1. Si bien TDP-43 es sintetizada en el compartimento citoplasmático y realiza un transporte núcleo-citoplasma, bajo condiciones fisiológicas, TDP-43 es predominantemente nuclear [14-16]. La estructura de esta proteína está conformada por dos dominios de reconocimiento a ARN (RRM1 y RRM2) [17], una secuencia bipartita de localización nuclear (NLS, Nuclear Localization Signal), una secuencia de exportación nuclear (NES, Nuclear Export Signal) y un dominio carboxilo terminal rico en glicina que media interacciones con otras ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (hnRNPs, por sus siglas en inglés) *(Figura 4)* [16, 18].

2.1 Fisiología de TDP-43

TDP-43 fue inicialmente identificada durante la caracterización de factores proteicos capaces de unirse al elemento respondedor transactivo (TAR, por sus siglas en inglés) del virus de inmunodeficiencia humana VIH-1 [19]. TDP-43 es una proteína de unión a ADN/ARN capaz de asociarse a diversas proteínas de la maquinaria de transcripción, también puede unirse a regiones promotoras y actuar como un represor transcripcional de genes río abajo de dichas secuencias. Sin embargo, la mayor parte de los estudios sobre la función de TDP-43 están relacionados con la regulación del

estabilidad de los trascriptos. Estudios recientes muestran que en estos sitios distales de unión, TDP-43 funcionaría como un represor de splicing de exones crípticos no conservados y de esta forma mantendría la integridad del intrón [25]. Cabe destacar que la presencia de exones crípticos introduce cambios en el marco de lectura y/o codones stop prematuros, que llevan a la degradación de los trascriptos.

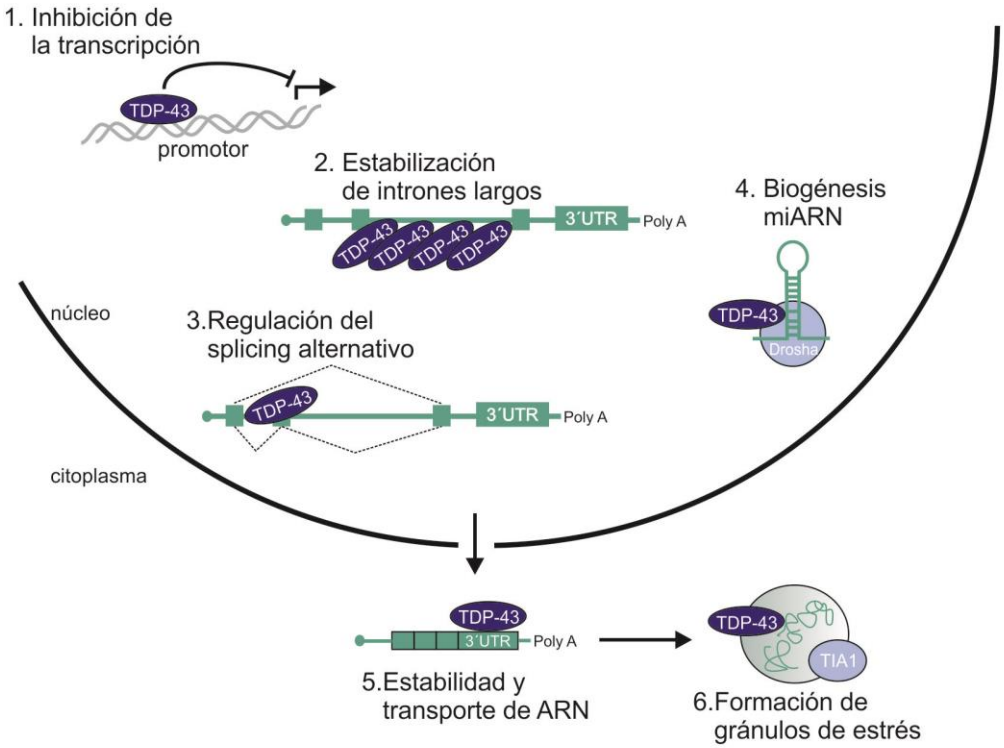

Figura 5: Funciones fisiológicas propuestas de la proteína TDP-43.
1: TDP-43 se une a regiones promotoras ricas en TG bloqueando la transcripción de genes río abajo. 2: se une a regiones intrónicas largas de trascriptos manteniendo sus niveles. 3: controla los procesos de splicing de más de 950 ARNs. 4: interactúa con Drosha involucrándose en la biogénesis de miARNs. 5: se une a regiones 3´UTRs de un gran número de ARNm favoreciendo su estabilidad y transporte. 6: forma complejos con otras proteínas de unión a ARN participando en la formación de gránulos de estrés. 3´UTR: regiones 3' no codificantes.

Además, TDP-43 se une a regiones 3´ no codificantes (3´ UTRs, por sus siglas en inglés) de ARNm, favoreciendo la estabilidad y transporte de los mismos, y a ARN largos no codificantes, donde se cree que participa con su función regulatoria. La lista de los blancos de unión de TDP-43 se encuentra enriquecida en trascriptos con intrones largos (los cuales se encuentran en mayor proporción en lisados de cerebro) y trascriptos cuyas funciones están relacionadas con la actividad sináptica o el

desarrollo neuronal como ARNm que codifican para proteínas sinápticas y para la proteína colina acetil transferasa [22, 23].

Además de su papel en el metabolismo del ARNm, existen evidencias de que TDP-43 participa en la biogénesis de micro ARNs. TDP-43 se localiza en las fibras de pericromatina, donde se estima que ocurre la biogénesis e interactúa con el complejo primario de procesamiento de micro ARNs Drosha [26].

El rol multifuncional y la importancia fisiológica de TDP-43 se demuestran por la letalidad embrionaria temprana en ratones knockout para el gen *Tardbp* [27, 28] y por los mecanismos de regulación que han evolucionado para mantener los niveles estables, evitando la toxicidad causada por alteraciones en los niveles de expresión de TDP-43. El mecanismo de esta regulación ha sido recientemente descripto y sería a través de un sistema de autorregulación. La propia proteína TDP-43 se une al extremo 3´UTR de su pre-ARNm, provocando el splicing de un intrón alternativo. Esta variante del ARNm de TDP-43 será marcada para degradación mediada por mutación sin sentido (NMD: *nonsense-mediated decay*) o degradación mediada por exosoma [22, 29, 30].

3. Proteinopatías de TDP-43

3.1 Demencia frontotemporal y Esclerosis lateral amiotrófica

La DFT es una condición neurodegenerativa progresiva y letal que se caracteriza por atrofia selectiva de los lóbulos frontales y temporales del cerebro. Es un desorden heterogéneo desde el punto de vista clínico, patológico y genético. La DFT es la demencia más común en individuos menores de 65 años (prevalencia 15-22/100.000) y, clínicamente, se caracteriza por cambios en el comportamiento, la personalidad, la aparición de déficits en tareas ejecutivas y disfunciones en el lenguaje [31]. Si bien históricamente fue clasificada como una demencia cortical, hoy en día, está claro que individuos afectados con DFT pueden tener asociados problemas motores como enfermedad de motoneurona (EMN) [32-34]. Tanto hombres como mujeres son igualmente afectados y esta condición tiene una distribución mundial. El término DFT se utiliza para describir pacientes con tres síndromes clínicos distintivos que no encuadran dentro de las características de la enfermedad de Alzheimer. Estos tres subtipos de DFT incluyen la variante conductual (bvFTD, por sus siglas en inglés), que se caracteriza por anormalidades conductuales prominentes; y otros dos subtipos con déficits en el lenguaje: la variante semántica con afasia primaria progresiva (svPPA) y la variante no fluida con afasia primaria progresiva (nfvPPA) [35,

36]. El subtipo más común de DFT es la variante conductual, caracterizado por cambios en la personalidad y conducta social. Se presenta con desinhibición, conductas compulsivas o perseverantes, apatía y bloqueo emocional. La variante semántica muestra una pérdida conceptual en la comprensión de palabras, caras o personas. Los pacientes frecuentemente refieren una “pérdida de memoria de palabras” y poseen un discurso fluido pero vacío, con un gran uso de las palabras “eso” y “esa cosa”, aunque los aspectos gramaticales se encuentran conservados [31, 33]. Los pacientes con nfvPPA presentan típicamente un lenguaje no fluido, una pérdida gradual del lenguaje expresivo con alteraciones fonológicas y gramaticales. Sin embargo, a diferencia de los pacientes svPPA, la comprensión de palabras está bien conservada [33, 35]. Histológicamente, esta enfermedad se ha identificado en base a la presencia de inclusiones cerebrales positivas para la proteína tau o para ubiquitina. El grupo de casos con lesiones positivas para ubiquitina, pero negativas para tau o α-sinucleína, históricamente, se ha denominado DFT-U, y constituye el subtipo neuropatológico más común de DFT [33, 37].

La ELA, también conocida en los Estados Unidos como enfermedad de Lou Gehrig, es una enfermedad neurodegenerativa de aparición en el adulto e involucra la muerte prematura de las neuronas motoras superiores e inferiores, llevando a la atrofia muscular, parálisis y muerte por falla respiratoria. En general, el comienzo de la enfermedad se manifiesta entre los 60 y 70 años, teniendo una incidencia de 2,6/100.000 [38]. Si bien existen genes identificados en las formas familiares de esta patología, aproximadamente, el 90 % de los casos de ELA son esporádicos (sin un historial familiar) y no tienen causa conocida, mientras que el restante 10 % tiene una base genética. En 1993, se identificó la primera causa genética para los casos de ELA familiar, esta involucra mutaciones en el gen de la superóxido dismutasa 1 (SOD1) [39]. De todos modos, estas mutaciones representan solo el 10% de los casos familiares en ELA. Es importante mencionar que una proporción de pacientes con ELA desarrollan demencia consistente con la DFT. La neuropatología de esta enfermedad se caracteriza por la presencia de inclusiones anormales, positivas para ubiquitina, en el citoplasma de las motoneuronas en proceso degenerativo. Además, existen evidencias de que la ELA es una enfermedad neurodegenerativa multisistémica, con agregados proteicos patológicos en regiones adicionales, incluyendo al hipocampo y regiones neocorticales [33].

En 2006, Neumann y col. identificaron a la proteína TDP-43 como el principal componente de las inclusiones en cerebro y médula espinal de casos familiares y esporádicos, tanto de DFT con inclusiones ubiquitinadas (DFT-U) como en los casos de ELA [6]. Dicho trabajo demostró, además, que formas patológicas de TDP-43 son

insolubles, están hiperfosforiladas, ubiquitinadas y truncadas de manera tal que se generan fragmentos carboxi-terminales de TDP-43. Dado que TDP-43 no solo resultó el marcador más sensible y confiable en estos casos, sino que además presenta una firma bioquímica-patológica específica, fue propuesta como la principal proteína patológica en los casos de DFT-U. De esta manera, los casos de DFT con prominente patología de TDP-43 fueron renombrados como DFT-TDP, aquellos casos con abundante patología Tau fueron nombrados DFT-Tau y un porcentaje menor de casos caracterizados por otra proteína de unión a RNA, la proteína FUS, fueron nombrados como DFT-FUS. Cerca del 45% de todos los casos de DFT y más del 95% de los casos de ELA están caracterizados por inclusiones TDP-43 positivas *(Figura 6)* [26, 40].

Muchos casos de DFT y ELA pueden clasificarse fácilmente de acuerdo a las características clínicas más importantes asociadas a cada condición. Sin embargo, una proporción de casos sospechosos de DFT y ELA presentan características clínicas comunes a ambas patologías. Se estima que un 15% de los pacientes con DFT alcanzan criterios de EMN y pacientes con ELA pueden presentar disfunciones comportamentales y cognitivas consistentes con una clínica típica de DFT. En general, si los pacientes se presentan primariamente con un deterioro cognitivo, son llamados DFT con enfermedad de motoneurona (DFT-EMN), mientras que si inicialmente se presentan con alteraciones motoras son llamados ELA más demencia (ELA-D). La presencia de inclusiones TDP-43 positivas y ausencia de inmunorreactividad normal nuclear de TDP-43 es la firma histopatológica para estos casos, donde existe un solapamiento en la clínica entre ambas patologías [41]. De esta manera, ELA y DFT están ligadas clínica, patológica y mecanísticamente. Por esta razón, ambas entidades son reconocidas actualmente como representativas de un continuo fenotipo clínico y patológico (desde una afectación puramente de neuronas motoras en ELA, a una afectación en la corteza frontal y temporal en DFT) dentro del mismo desorden neurodegenerativo conocido como proteinopatías de TDP-43 [41].

3.2 Desórdenes neurodegenerativos con patología de TDP-43 secundaria

Sumado a los casos de DFT-TDP y ELA, en donde la patología de TDP-43 se presenta como la principal característica histopatológica, las inclusiones de TDP-43 también pueden ser detectadas como una característica patológica secundaria en muchos otros desórdenes neurodegenerativos. Se ha reportado que las inclusiones de TDP-43 se presentan como patología secundaria en casos de EA, EP (y otras condiciones relacionadas) y EH [41, 42]. Según diferentes estudios, la proporción de

pacientes con EA que presentan patología de TDP-43 varía desde un 19 a 57% con una distribución variable de las inclusiones [43]. Las inclusiones patológicas de TDP-43 observadas en EP, EP con demencia y demencia con cuerpos de Lewy se localizan principalmente en el lóbulo temporal y afecta hasta el 60% de los casos [44, 45]. Aunque la importancia clínica de una patología de TDP-43 concomitante con estas otras enfermedades es aún desconocida, la identificación de lesiones positivas para TDP-43 en las enfermedades neurodegenerativas en general y en ELA/DFT en particular, sugiere que se ha identificado una clase única de proteinopatías neurodegenerativas que no es una amiloidosis (ver revisión de [46]).

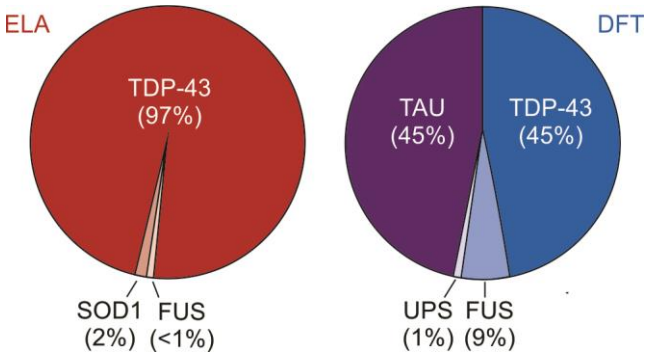

Figura 6: Clasificación de DFT y ELA en base al principal componente proteico acumulado.
Aproximadamente 45% de los casos clínicos de DFT exhiben patología de TDP-43 (DFT-TDP), el resto está caracterizado por patología tau (DFT-tau), patología FUS (DFT-FUS) y otras formas neuropatológicas asociadas al sistema ubiquitina-proteasoma (UPS, por sus siglas en inglés). La patología de TDP-43 se encuentra en la mayoría de los casos de ELA (Adaptado de [26]).

3.3 Genética asociada a proteinopatías de TDP-43

Desde un punto de vista genético, DFT y ELA son entidades extraordinariamente diversas. La lista de genes asociados ya sea a DFT o ELA, incluye a *MAPT* (codifica para TAU), *TARDBP* (codifica a TDP-43), Fused in Sarcoma (*FUS*, por sus siglas en inglés), superóxido dismutasa 1 (*SOD1*), ubiquilina 2 (*UBLN2*), optineurina (*OPTN*), progranulina (*PGRN*), *VCP* (Valosin Containing Protein), ataxina 2 (*ATXN2*), receptor sigma 1 no opioide (*SIGMAR1*), *CHMP2B* (Charged Multivesicular body Protein 2B), secuestosoma 1 (*SQSTM1*), *CHCHD10* (Coiled-coil-Helix-Coiled-coil-Helix Domain containing 10) y *C9orf72* (marco de lectura 72 del cromosoma 9) [38, 47]. Un detalle de los genes implicados junto a la presentación patológica en DFT y ELA se muestra en la *Tabla 2*.

neurodegeneración [55], confirmando el descubrimiento inicial de la conexión entre la patología de TDP-43 y los casos de DFT y ELA. Sin embargo, las mutaciones en *TARDBP* representan menos del 4% de los casos familiares en ELA y resultan menos frecuentes en casos de DFT. La mayoría de las mutaciones descriptas en *TARDBP*, asociadas a casos esporádicos y familiares de ELA y FDT, son dominantes y se concentran en el dominio rico en glicinas (ver *Figura 4*), sugiriendo que la alteración de la función de este dominio es suficiente para inducir un efecto patológico [56, 57].

Recientemente, se ha descripto que la expansión del hexanucleótido GGGGCC en una región no codificante del gen *C9orf72* es la causa genética más común dentro de los casos familiares y esporádicos de ELA y/o DFT-TDP [51, 52]. La expansión de repeticiones en C9orf72 explica un 30-50% y un 5-7% de los casos familiares y esporádicos de ELA, respectivamente; y un 25% y 6% de los casos familiares y esporádicos de DFT, respectivamente [38]. *C9orf72* codifica para una proteína de la cual se desconoce su función. La expansión de repeticiones patológicas se extiende, aproximadamente, desde 30 hasta más de 1000 y parecería que no existe una conexión directa entre la severidad de la condición y la longitud de la expansión por encima del rango normal. Neuropatológicamente, la mayoría de los casos con mutaciones en C9orf72 presentan la variante tipo 2 (ver en Neuropatología, subtipos patológicos de TDP-43) dentro de la patología de TDP-43. Adicionalmente, se observan inclusiones citoplasmáticas pequeñas p62 positivas (marcador para proteínas destinadas a degradación vía proteasoma), TDP-43 negativas y focos de agregación de ARN nucleares en cerebelo e hipocampo [58]. La región que presenta repeticiones del hexanucleótido es traducida bidireccionalmente por un mecanismo de traducción no canónico independiente del codón de iniciación ATG, obteniendo proteínas formadas por dipéptidos repetitivos de agregación (Di-Peptide Repeats, DPR, por sus siglas en inglés): poli-(Gly-Ala), poli-(Gly-Pro), poli-(Gly-Arg), poli-(Pro-Ala) y poli-(Pro-Arg). Estas proteínas DPR colocalizan con inclusiones p62 positivas/TDP-43 negativas en el espectro de casos DFT-ELA con mutaciones en C9orf72 [59]. De modo interesante, no parece existir una correlación clara entre la patología por DPR y los fenómenos de neurodegeneración. Sin embargo, estudios recientes en modelos celulares sugieren una potencial toxicidad causada por la acumulación de estas proteínas [60].

4. Neuropatología en DFT y ELA

La neuropatología de DFT y ELA se caracteriza, generalmente, por inclusiones TDP-43 positivas citoplasmáticas neuronales (ICNs), inclusiones intranucleares neuronales (IINs), neuritas distróficas (NDs) e inclusiones citoplasmáticas gliales (ICGs) [61]. Estudios bioquímicos en muestras de cerebro postmortem demostraron la firma bioquímica patológica específica de TDP-43, caracterizada por la acumulación de especies insolubles de TDP-43, incluyendo formas fosforiladas, formas ubiquitinadas de alto peso molecular y formas clivadas, generando fragmentos C-terminales de 20-25 kDa (FCTs) *(Figura 7)* [6]. La fosforilación anormal del extremo C-terminal de la proteína (pTDP-43) llevó al desarrollo de anticuerpos específicos para estas formas aberrantes que detectan específicamente los agregados patológicos, dejando a la proteína normal sin marcar. Por lo tanto, la detección de p-TDP-43 por inmunohistoquímica es el método actual elegido para el diagnóstico de proteinopatías de TDP-43 en la evaluación neuropatológica. En DFT-TDP, la patología de TDP-43 puede observarse a lo largo del sistema nervioso central, aunque la corteza occipital y el cerebelo permanecen relativamente poco afectados. De acuerdo a las distintas morfologías de las inclusiones, su distribución, densidad y perfil inmunohistoquímico, los casos de DFT-TDP pueden clasificarse en 4 subtipos principales dentro de la patología de TDP-43. La variante tipo 1 se caracteriza por predominancia de neuritas distróficas alargadas y una abundancia relativa de ICNs en capas corticales superficiales, mientras que el subtipo 2 esta delineado por una predominancia de INCs tanto en capas superficiales como en capas corticales más profundas, pero se observan muy pocas NDs. En la variante tipo 3, se pueden encontrar abundantes ICNs y NDs, principalmente en capas corticales superficiales; y en la patología tipo 4, asociada a mutaciones en el gen de *VCP*, la mayoría de las inclusiones resultan nucleares y se observan NDs cortas [62, 63]. Por otro lado, los casos de ELA con inclusiones de TDP-43 se clasifican como el subtipo 5 dentro de la patología de TDP-43. El patrón de distribución de las inclusiones observadas en ELA difiere del presentado en DFT-TDP, en donde se ven afectadas, principalmente, las neuronas motoras superiores e inferiores. En estos casos, la histopatología de TDP-43 se caracteriza por inclusiones citoplasmáticas en forma de maraña o de apariencia densa y granular. Las áreas más severamente afectadas dentro del sistema nervioso central en ELA son la corteza motora, la médula espinal, los ganglios basales y el tálamo. Esta distribución diferencial de las inclusiones explica por qué ELA es categorizada como un subtipo diferente dentro de la patología de TDP-43 [64].

4.1 Modificaciones postraduccionales: Fosforilación – Ubiquitinación – Clivaje

Al igual que otras proteínas involucradas en inclusiones intracelulares asociadas a enfermedades neurodegenerativas, como tau y α-sinucleína, los agregados patológicos de TDP-43 suelen estar ubiquitinados y fosforilados. Bajo condiciones normales, estas modificaciones no son detectadas en el tejido cerebral, por lo tanto, la presencia de estas especies de TDP-43 en ELA y DFT-TDP resultan específicas de la condición patológica. Sin embargo, no puede precisarse si estas modificaciones conllevan a la formación de agregados y/o efectos neurotóxicos, o si representan una reacción normal frente a la presencia de los agregados intracelulares y están, de esta manera, indirectamente relacionadas con la neurodegeneración mediada por TDP-43. Estudios en tejido humano indican que no todas las inclusiones TDP-43 positivas son también positivas para ubiquitina. En particular, aquellas llamadas preinclusiones (inclusiones citoplasmáticas granulares, menos densas), generalmente, no son ubiquitina positivas, sugiriendo que la ubiquitinación es un fenómeno tardío en el proceso patológico. Por el contrario, los anticuerpos específicos para las variantes de TDP-43 fosforiladas en los residuos de serina 409 y 410, parecen reconocer prácticamente la mayoría de las inclusiones, infiriéndose que la fosforilación es un evento que precede a la ubiquitinación *(Figura 8)* [65].

Se cree que el mecanismo principal de eliminación celular de TDP-43 es por medio del SUP. Por lo tanto, la alteración de este sistema podría contribuir al incremento de los niveles de proteína TDP-43 ubiquitinada en DFT-TDP y ELA. De hecho, la inhibición del SUP provoca un aumento en los niveles de especies ubiquitinadas de TDP-43 de alto peso molecular en un modelo celular de sobreexpresión de TDP-43 [16, 66]. TDP-43 tiene una vida media larga, de entre 12-34 h, según estudios en diferentes líneas celulares [50, 67], mientras que la variante fosforilada presenta una vida media aún más larga, sugiriendo que la fosforilación podría inhibir la degradación mediada por el SUP y, de esta forma, contribuir a la formación de agregados. Alternativamente, como la fosforilación de TDP-43 está asociada con la insolubilidad y agregación de la proteína, es posible que la propia agregación haga menos vulnerable a TDP-43 a la degradación mediada por el SUP y que la fosforilación solo sea un marcador de agregación. Por tal motivo, existe evidencia de que la fosforilación de TDP-43 puede resultar en una degradación y/o toxicidad diferencial de la proteína; no obstante, el rol preciso de esta modificación postraduccional en el proceso patológico no es claro, dado que la fosforilación de TDP-43 está estrechamente correlacionada con el fenómeno de agregación, siendo difícil determinar si es causa o efecto del mismo.

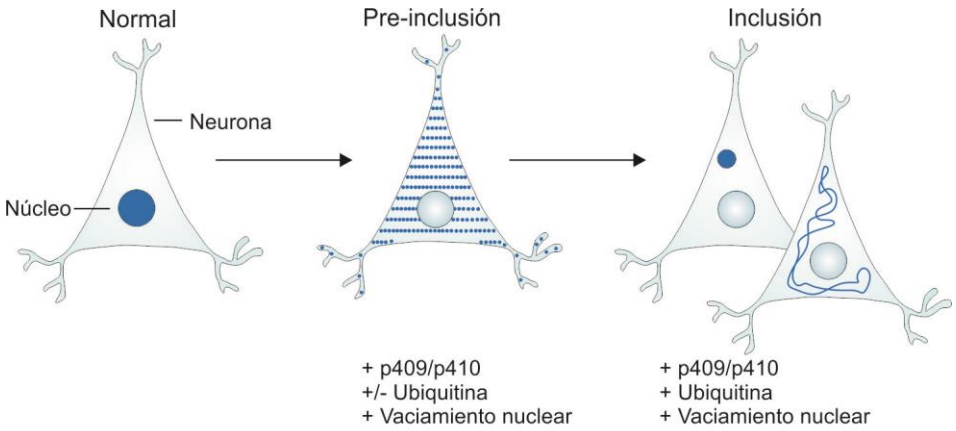

Figura 8: Ciclo de vida patológico de TDP-43.
Las neuronas normales presentan una robusta señal intranuclear de TDP-43 (azul). Las llamadas pre-inclusiones muestran una estructura en forma de agregados granulares citoplasmáticos positivos para fosfo-TDP-43 (p409/p410) pero, en general, resultan negativos para ubiquitina. Las neuronas con pre-inclusiones presentan la característica pérdida de TDP-43 nuclear. Las inclusiones exhiben una variedad de morfologías desde densas y redondas, hasta inclusiones citoplasmáticas en forma de maraña en motoneuronas (Modificado de [47]).

Como se describió anteriormente, la firma bioquímica de las proteinopatías de TDP-43 incluyen la presencia de especies clivadas de TDP-43 de entre 20-25 kDa [6]. Por secuenciación de la región N-terminal de estos fragmentos, derivados de lisados de muestras de cerebro, se demostró que, al menos uno de estos fragmentos, corresponde a un FCT que comienza en la arginina 208 de TDP-43 [66]. Sin embargo, existe variabilidad en el número de bandas obtenidas por Western Blot correspondientes a FCTs, dependiendo del caso patológico que se analice. Se presume que esta variabilidad es generada por diferentes sitios de clivaje de la proteína TDP-43, aunque también pueden reflejar variantes alternativas de splicing o sitios crípticos de iniciación de la traducción [68]. A partir de estudios en cultivos celulares, se propuso a la proteína reguladora de apoptosis caspasa 3, como la principal proteasa responsable de generar el fragmento de 25 kDa derivado de TDP-43 [68, 69]. Dado que TDP-43 contiene 3 sitios consenso de clivaje de caspasa 3 y que, además, esta proteasa es capaz de clivar a TDP-43 en fragmentos de 25-35 kDa, tanto *in vitro* como en cultivos celulares [70], esta sugerencia resulta plausible. Es interesante que las inclusiones corticales en casos de ELA y DFT-TDP son fácilmente inmunodetectadas utilizando anticuerpos que reconocen el dominio C-terminal de TDP-43, pero no con anticuerpos dirigidos al extremo N-terminal. Por otro lado, las inclusiones de médula espinal en neuronas motoras, son marcadas con anticuerpos C- o N-terminal, sugiriendo que estos agregados están compuestos por especies no clivadas de TDP-43 [71]. Esta heterogeneidad regional en términos de formación de

FCTs plantea que no serían estrictamente necesarios para la degeneración mediada por TDP-43.

4.2 Agregación

La marca histopatológica de DFT-TDP y ELA es la presencia de agregados densos de TDP-43 en neuronas y células gliales afectadas [6]. Si bien la presencia de agregados proteicos es algo común dentro de las enfermedades neurodegenerativas, en muchos de estos casos se desconoce si estas inclusiones tienen una función tóxica, una función protectora, o ambas, pero en diferentes estados de la progresión patológica. De hecho, la alta correlación entre la presencia de agregados de TDP-43 y otros cambios patológicos como el vaciamiento nuclear, ubiquitinación o fosforilación, hace difícil determinar si la agregación es el evento patogénico que provoca la neurodegeneración y, por lo tanto, la enfermedad. Como se mencionó anteriormente, se ha postulado que la aparición de agregados granulares citoplasmáticos de TDP-43, conocidos como preinclusiones, es un evento temprano en la formación de las inclusiones [63]. En particular, aquellas neuronas que albergan preinclusiones, también poseen la pérdida normal de inmunorreactividad nuclear de TDP-43, es decir, el vaciamiento nuclear de TDP-43. En sistemas celulares de sobreexpresión de la versión salvaje de TDP-43, la formación de agregados no es tan frecuente, observándose raramente inclusiones. No obstante, la sobreexpresión de una variante citoplasmática de TDP-43 (con mutación dirigida a la secuencia de localización nuclear) o la sobreexpresión de FCTs de TDP-43 da como resultado la formación de numerosas inclusiones [16, 66, 72]. Por otro lado, la transducción de agregados preformados recombinantes en el citoplasma de células que sobreexpresan la proteína TDP-43 induce la formación de nuevos agregados, probablemente por un mecanismo de siembra y transmisión por autopropagación de la forma proteica aberrante mediada por los agregados preformados, como lo observado en modelos de tau y α-sinucleína [7].

Estudios en tejido de pacientes con ELA esporádica, que han cursado la enfermedad por periodos inusualmente largos (10-20 años), mostraron un bajo número de inclusiones de TDP-43 en comparación con casos estándar de ELA. El hecho de que el número de neuronas que albergan inclusiones sea bajo en casos de larga duración de la patología, sugiere que las neuronas que presentan inclusiones de manera temprana en el proceso patológico son más susceptibles a degenerar [73]. La muerte selectiva de neuronas que albergan agregados indica que estos están conectados estrechamente con el fenómeno de neurodegeneración. Sin embargo,

estos hallazgos no demuestran si los agregados de TDP-43 son de por sí tóxicos, o si son una respuesta al daño celular y, por ende, solo son marcadores de otro proceso neurotóxico. En modelos animales de sobreexpresión de TDP-43, en general, las inclusiones TDP-43 positivas resultan raras, observándose en baja proporción [74-77]. Más aun, la cuantificación de las inclusiones TDP-43 positivas no revelan una correlación entre el número de inclusiones y el fenómeno neurodegenerativo [77]. En consecuencia, la agregación de TDP-43 podría no ser un requerimiento absoluto para la neurodegeneración observada *in vivo*; de todos modos, esto no excluye la posibilidad de que los agregados puedan contribuir a la disfunción y muerte neuronal.

4.3 Pérdida de localización nuclear

El cambio patológico más intrigante asociado a DFT-TDP y ELA es la pérdida de la localización normal de TDP-43 dentro del núcleo de aquellas células que albergan inclusiones. Este fenómeno de vaciamiento nuclear parecería ser un evento temprano en el curso patogénico, observándose en aquellas células que presentan preinclusiones o inclusiones negativas para ubiquitina [6, 65]. TDP-43 se localiza normalmente en regiones de eucromatina en el nucleoplasma, incluyendo zonas pericromatínicas y gránulos intercromatínicos, donde ocurre la transcripción y procesamiento postranscripcional [78]. Esta localización de TDP-43 dentro de dominios específicos del nucleoplasma es requerida para su función normal, por tanto, es razonable pensar que este efecto de vaciamiento nuclear altere las funciones fisiológicas normales de TDP-43 dentro del núcleo celular. En estudios previos realizados en el modelo murino de sobreexpresión de una variante citoplasmática de TDP-43 utilizado en este trabajo de investigación, se observó que existe una correlación entre la neurodegeneración y la pérdida de localización nuclear normal de la proteína TDP-43 endógena y, no así, con la formación de inclusiones [77]. Como se mencionó con anterioridad, recientemente se ha identificado a TDP-43 como un represor de exones crípticos no conservados [25]. En este mismo trabajo se observó que la represión de exones crípticos se encuentra alterada en casos de DFT-ELA. Si bien se necesitan más estudios sobre qué genes se ven afectados específicamente por la presencia de exones crípticos en el contexto patológico, dicho estudio también propone una correlación entre la patología de TDP-43 y la pérdida de una función potencialmente crítica.

Por otro lado, si bien la mayoría de las inclusiones de TDP-43 son extranucleares, algunas de ellas se pueden encontrar además en la región nuclear, donde exhiben una morfología lenticular o de “ojo de gato”, con vaciamiento del resto

del nucleoplasma. Por lo tanto, esta pérdida de su localización normal dentro del núcleo es considerada un evento de deslocalización.

5. Modelos de Neurodegeneración mediada por TDP-43

A pesar de los grandes avances en cuanto a la conexión entre la presencia de formas patológicas de TDP-43 y la neurodegeneración en DFT-TDP y ELA, aún es necesario comprender con mayor claridad las cascadas de eventos asociadas a los mecanismos patológicos mediados por TDP-43. Probablemente, múltiples vías estén involucradas en este proceso y las consecuencias derivadas de la fosforilación, agregación, clivaje y vaciamiento nuclear de TDP-43 todavía no sean claras. Actualmente, permanece sin resolver si la neurodegeneración es causada por una pérdida de función de la proteína TDP-43, por una ganancia de función tóxica de los agregados o por una combinación de ambos efectos [47]. Dada la gran cantidad de funciones fisiológicas de TDP-43, se podría conjeturar que la ausencia de TDP-43 nuclear implica un fenómeno de pérdida de función normal, la cual sería suficiente para provocar neurodegeneración. Alternativamente, la proteína TDP-43 deslocalizada en el citoplasma podría retener su capacidad de unión a ARN, secuestrando trascriptos específicos en ese compartimento y, por lo tanto, implicando una ganancia de función tóxica de los agregados. Otra posibilidad es que los FCTs clivados actúen de manera dominante negativa interactuando con otras moléculas hnRNPs y, de esta forma, imposibilitando el transporte de sus “cargamentos” normales de ARN.

Se han propuesto distintos mecanismos que intentan explicar el fenómeno neurodegenerativo mediado por TDP-43. Uno de estos modelos es el llamado “pérdida de autorregulación”, propuesto de forma simultánea e independiente por dos grupos de investigación [22, 29]. Si bien se debate cuál sería el daño inicial, se cree que fenómenos de estrés celular son los causantes del cambio de distribución de TDP-43 hacia el citoplasma. Esta redistribución sostenida resulta en la agregación y formación de preinclusiones de TDP-43 que son hiperfosforiladas, gradualmente ubiquitinadas y difíciles de degradar. Estas inclusiones citoplasmáticas conducen a una mayor redistribución de la proteína TDP-43 normal desde el núcleo, incrementando la formación de agregados y, paralelamente, provocando el vaciamiento nuclear de la proteína. Si, en efecto, la autorregulación de TDP-43 ocurre a nivel nuclear [22], entonces se genera una pérdida en el control de autorregulación, un aumento de la expresión de TDP-43 y un incremento de la formación de agregados citoplasmáticos *(Figura 9)*. Finalmente, este mecanismo se retroalimentaría de forma positiva, llevando a la muerte celular. Alternativamente a este modelo también se ha propuesto el

modelo de “ganancia de autorregulación”. En esta variante, de forma similar al modelo anterior, un daño inicial provoca la relocalización de TDP-43 al citoplasma y formación de agregados. Sin embargo, plantea que el mecanismo de autorregulación es un evento citoplasmático, en este caso, las variantes patológicas de TDP-43 retienen su habilidad de unirse a ARN (por ende, la capacidad de autorregular su propio trascripto). Un incremento de TDP-43 citoplasmático se traduciría en un aumento de la autorregulación, reduciendo los niveles de mensajero de TDP-43 y, en consecuencia, disminuyendo la proteína TDP-43 sintetizada *de novo* en las células afectadas. Esta disminución de la síntesis se vería reflejada en el fenómeno de vaciamiento nuclear y, dado la multiplicidad de funciones fisiológicas de TDP-43, la pérdida de sus niveles nucleares podría aumentar aún más el estrés celular, llevando nuevamente a la muerte celular.

El mecanismo por el cual se gatilla el proceso inicial de relocalización/agregación de TDP-43 todavía se desconoce. A pesar de esto, existe cierto consenso en que la disrupción de la homeostasis, tanto proteica como del ARN, constituye la base de los eventos patológicos en DFT y ELA. La causa inicial que desencadena el proceso patológico se puede dar a diferentes niveles, tanto en la vía de homeostasis proteica como de ARN, incluyendo factores genéticos que predisponen la falla en alguna de las vías u otros factores no genéticos como estrés o envejecimiento celular [21, 26].

6. Modelos animales de proteinopatías de TDP-43

Avances en el desarrollo de modelos animales basados en la expresión o knockout de proteínas neuropatológicas han llevado a un mayor entendimiento de los mecanismos patológicos involucrados en las enfermedades neurodegenerativas. Históricamente, los estudios en ELA estuvieron enfocados en mutaciones patológicas de *SOD1* asociadas a formas familiares de la enfermedad [79, 80]. Sin embargo, el descubrimiento del papel de TDP-43 en ELA, DFT [6], y en otras enfermedades neurodegenerativas, desencadenó el uso de diversos sistemas de expresión y modelos que fueron desarrollados durante el estudio de otras proteínas neuropatológicas como la proteína precursora amiloide (PPA), tau, α-sinucleína y huntingtina [81-83]. Por consiguiente, el conocimiento ganado por el estudio previo de estas proteínas permitió una rápida evolución en el uso de modelos animales basados en TDP-43 y en la comprensión de los mecanismos patológicos subyacentes.

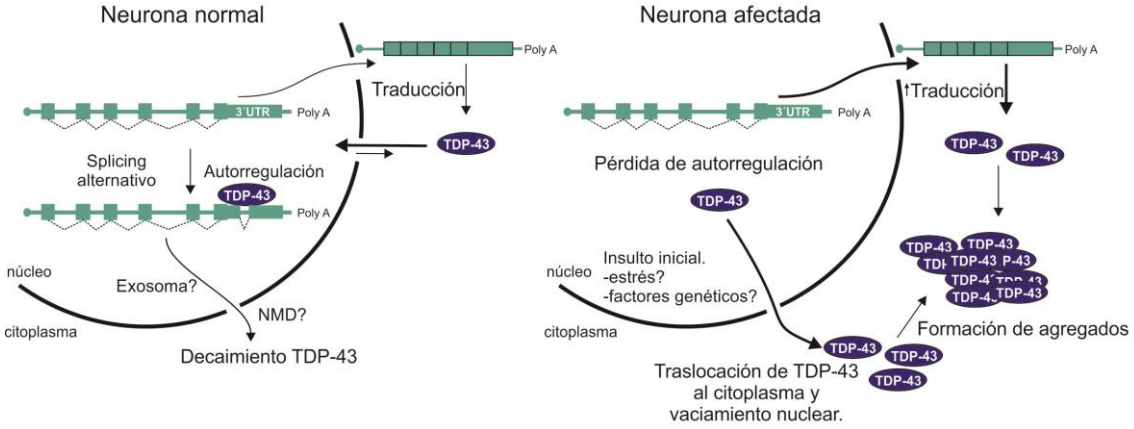

Figura 9: Modelo patológico de TDP-43 por pérdida de autorregulación.

Actualmente, se han reportado diversos estudios de sobreexpresión de TDP-43 en *Drosophila* [84, 85], *C.elegans* [86, 87], pez cebra (*D. rerio)* [88], levaduras [89] y embriones de pollo [57], los cuales han recapitulado aspectos moleculares y celulares de DFT-TDP y ELA, documentando una variedad de fenómenos degenerativos.

Respecto a modelos en roedores, estudios en animales knockout para TDP-43 mostraron letalidad durante el desarrollo embrionario (en E7.5), sugiriendo una función crítica de TDP-43 durante la embriogénesis y la falta de redundancia con otras ribonucleoproteínas. Sin embargo, los ratones heterocigotas para la modificación genética lograron vivir hasta la adultez, desarrollando déficits motores [90]. También han surgido modelos basados en la utilización de vectores virales para dirigir la sobreexpresión de TDP-43 en ratas. Tatom y colaboradores [91] utilizaron un vector viral (AAV9) inyectado mediante estereotaxia con el fin de expresar TDP-43 humana salvaje en la *substantia nigra* de ratas adultas, induciendo neurodegeneración dosis-dependiente y déficits motores progresivos. Otros grupos han utilizado la administración intravenosa de vectores virales para dirigir la expresión de TDP-43 a médula espinal, en ratas recién nacidas. Las ratas TDP-43 transducidas mostraron pérdida progresiva de peso, mayor tasa de mortalidad, niveles bajos de pérdida de motoneuronas y atrofia muscular [92].

Como se mencionó anteriormente, el estudio de Neumann y col. [6] estableció a TDP-43 como el principal sustrato neuropatológico en DFT-TDP y ELA, provocando grandes esfuerzos en la generación de diferentes modelos transgénicos murinos basados en esta proteína [74-77, 93-96]. Se emplearon diferentes estrategias para dirigir la expresión de TDP-43, por ejemplo, expresión ubicua, utilizando el promotor de la proteína prion [74, 76, 94, 96]; expresión neuronal específica, utilizando el promotor

del antígeno Thy1 [75, 93] y expresión condicional, utilizando el promotor CaMKIIα específico de cerebro anterior [77, 95]. Esta última estrategia fue la elegida en el modelo estudiado en este trabajo (ver más abajo). Si bien ningún modelo resulta perfecto, en conjunto, logran reproducir mediante la sobreexpresión de TDP-43 algunos aspectos patológicos presentes en DFT y ELA, como ser las alteraciones motoras, reducción de la sobrevida, insolubilidad de agregados proteicos, gliosis reactiva y pérdida neuronal. Sorprendentemente, más allá de la estrategia (promotor), la variante de TDP-43 utilizada (salvaje o versión mutante asociada a ELA) y del nivel de patología de TDP-43 encontrada, la presencia de déficits motores y la reducción de la sobrevida se presentan como consecuencias comunes en todos los modelos nombrados, remarcando la gran sensibilidad a los cambios en los niveles de TDP-43 y en su funcionalidad.

En este marco, Igaz y col. [77] previamente han generado y caracterizado neuropatológicamente un novedoso modelo de ratones transgénicos basado en la sobreexpresión condicional, en cerebro anterior, de la proteína TDP-43 humana (tTA/TDP-43-WT) y de una variante de localización citoplasmática (tTA/TDP-43-ΔNLS, modelo utilizado en el presente trabajo). Se empleó el promotor CaMKIIα, el cual dirige la expresión a hipocampo, estriado y corteza, pero no a otras áreas del sistema nervioso central como el cerebelo y médula espinal. Por medio de métodos bioquímicos, inmunohistoquímicos y moleculares se ha demostrado que estos ratones transgénicos, tanto para formas nucleares (tTA/TDP-43-WT) como citoplásmicas (tTA/TDP-43-ΔNLS), recapitulan una serie de características neuropatológicas de las proteinopatías de TDP-43, incluyendo neurodegeneración selectiva, formación de agregados proteicos de TDP-43, disminución de los niveles endógenos de TDP-43 y neuroinflamación progresiva *(Figura 10)* [77]. Es importante aclarar que, en este modelo, la sobreexpresión de TDP-43 no resultó tóxica en términos de mortalidad temprana, lo que permite un estudio de la progresión patológica similar a la neuropatología humana.

Recientemente, la misma variante de localización citoplasmática de TDP-43 usada en nuestro modelo (hTDP-43-ΔNLS) fue utilizada para generar un nuevo modelo murino transgénico, pero esta vez usando el promotor de la cadena pesada de neurofilamento para dirigir la expresión del transgén [97]. La expresión de hTDP-43-ΔNLS en estos ratones resultó en la acumulación de agregados fosforilados de TDP-43, pérdida de TDP-43 endógeno nuclear, atrofia cerebral, degeneración de motoneuronas y alteraciones motoras progresivas.

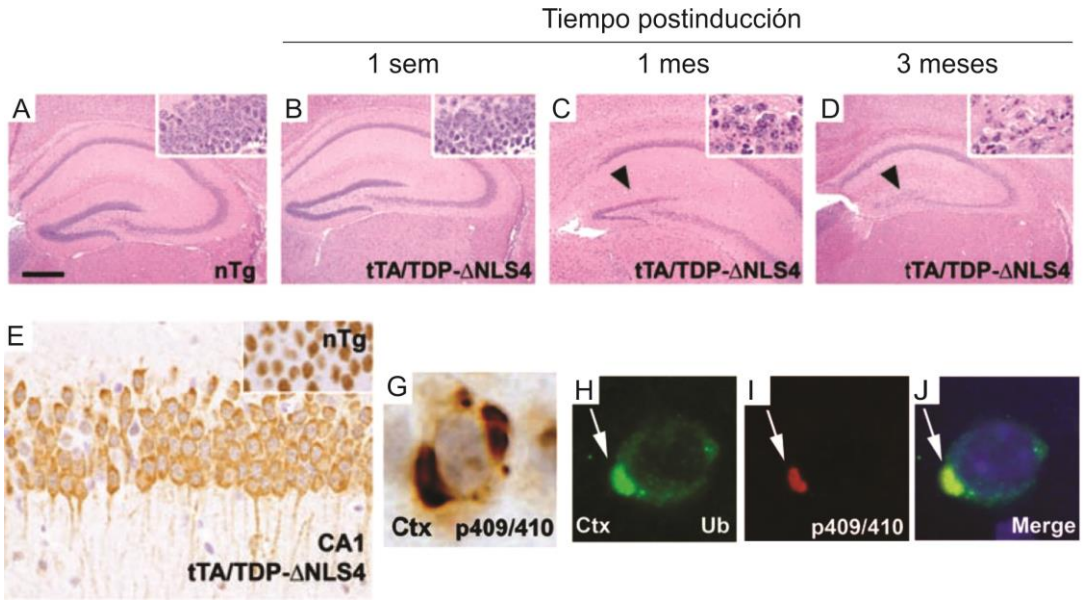

Figura 10: Caracterización neuropatológica del modelo tTA/TDP-43-ΔNLS.
A-D. Pérdida neuronal progresiva en tTA/TDP-43-ΔNLS. Tinción de hematoxilina-eosina en hipocampo de ratones tTA/TDP-43-ΔNLS (B-D) muestran una neurodegeneración progresiva en neuronas del giro dentado claramente evidente al mes de inducción del transgén. Comparar con animales no transgénicos (nTG, A). E. Inmunohistoquímica en corte de hipocampo de ratón tTA/TDP-43-ΔNLS de 1 mes de expresión con anti-TDP-43-humano+murino mostrando la localización predominantemente citoplasmática de TDP-43. Recuadro: ratón nTg. G. Inmunomarcación con anti-fosfo-TDP-43 (p409/p410) en corteza (Ctx) de animales tTA/TDP-43-ΔNLS de 1 mes de expresión mostrando la formación de agregados fosforilados. H-I. Colocalización de marcas patológicas en agregados de TDP-43. Inmunofluorescencia con anticuerpos anti-Ubiquitina (Ub, verde) y anti-fosfo-TDP-43 (p409/p410, rojo) demostrando colocalización en agregados citoplasmáticos de TDP-43 (flechas) en corteza (Ctx) de ratones tTA/TDP-43-ΔNLS de 1 mes de inducción (Adaptado de [77]).

Como se mencionó anteriormente, la causa genética más común en los casos de DFT-TDP y ELA corresponde a la expansión del hexanucleótido G_4C_2 en la región no codificante del gen C9orf72. Actualmente, se están comenzando a desarrollar modelos animales basados en estas expansiones de hexanucleótidos, simulando la neuropatología de los casos “c9DFT/ELA”. Recientemente, Chew y col. [98] desarrollaron un novedoso modelo transgénico mediante la administración intracerebroventricular del vector viral AAV9 para la transducción de 66 copias del hexanucleótido G_4C_2. Estos ratones desarrollaron focos nucleares de RNA, inclusiones formadas por proteínas DPR: poli-(Gly-Ala) / poli-(Gly-Pro) / poli-(Gly-Arg), inclusiones fosforiladas de TDP-43, pérdida neuronal, astrogliosis y pérdida de peso. Además, mostraron alteraciones conductuales, incluyendo hiperactividad, ansiedad, comportamientos antisociales y déficits motores.

7. Expresión génica mediada por TDP-43

Aunque se han realizado considerables esfuerzos luego del descubrimiento de la relación de TDP-43 con las patologías neurodegenerativas, al día de la fecha, las funciones celulares específicas no se comprenden en su totalidad. De todos modos, en los últimos años han surgido diversas evidencias en cuanto a la importancia de TDP-43 respecto a la regulación génica y al metabolismo/procesamiento del ARN. Dos grupos independientes, casi en forma simultánea, analizaron mediante la técnica de CLIP (UV Cross-Linking and ImmunoPrecipitation) y secuenciación de alto rendimiento (RNAseq) los posibles blancos de unión de TDP-43 por medio de la regulación río debajo de la proteína TDP-43 endógena, en diversos modelos [22, 23]. Estos estudios revelaron que TDP-43 interactúa directamente con una variedad de ARNs no codificantes, regiones intrónicas y regiones 3´ UTR, demostrando su participación en diferentes aspectos en la regulación y expresión génica. Así mismo, TDP-43 resultó crucial para mantener los niveles de una gran diversidad de ARNs asociados a funciones importantes dentro del sistema nervioso, como ser ARN mensajeros que codifican para proteínas asociadas a procesos y actividad sináptica, la colina acetil transferasa y proteínas asociadas a DFT-TDP/ELA como FUS y progranulina [22]. Estos trabajos también demostraron que TDP-43 se une a sus pre-ARNs blanco, principalmente, en múltiples sitios localizados en regiones intrónicas largas. Casualmente, estos ARNs con intrones largos se encuentran en gran proporción en los transcriptomas provenientes de cerebro, identificando de esta forma una posible causa a la vulnerabilidad neuronal observada en los procesos patológicos por la desregulación de TDP-43. En cuanto a la participación de TDP-43 en el splicing se lograron identificar una gran variedad de ARN mensajeros cuyos patrones de splicing fueron alterados luego de la reducción de los niveles de TDP-43 en el sistema nervioso de ratones adultos [22] o en una línea celular de neuroblastoma [23], confirmando el importante rol de esta proteína en los procesos de splicing alternativo. Dentro de estos blancos regulados por TDP-43 se incluyen exones de genes implicados en la sobrevida y desarrollo neuronal, sugiriendo que un proceso de splicing aberrante provocado por la pérdida de TDP-43, podría contribuir a desencadenar eventos degenerativos en el sistema nervioso.

El análisis transcriptómico en nuestro modelo murino de sobreexpresión de la variante citosólica de TDP-43 (hTDP-43-ΔNLS) reveló una alteración global de la expresión génica. Nuestros estudios previos de análisis de transcriptoma por micro-arreglos [77] y, recientemente, por análisis a mayor escala por secuenciación de ARN [99], mostraron un amplio efecto de la sobreexpresión citoplasmática del transgén,

incluyendo una regulación hacia arriba de genes relacionados con la transcripción, ensamble de la cromatina, el nucléolo y el metabolismo proteico. Por otro lado, se demostró también una disminución de los niveles de genes relacionados con la actividad sináptica y modificaciones postraduccionales. Estos efectos de la sobreexpresión de hTDP-43-ΔNLS parecerían ser distintos de aquellos causados por la pérdida de TDP-43 endógeno mencionados con anterioridad, sugiriendo que muchos de estos cambios observados en estos ratones transgénicos se podrían deber a una ganancia de función debido a la presencia de TDP-43 citoplasmático.

8. Genes tempranos inmediatos

El cerebro almacena información extraída desde la experiencia y la utiliza para modificar comportamientos a lo largo de la vida de un organismo. Se cree que esta capacidad depende de redes neuronales intrínsecas cuyas conexiones sinápticas pueden ser moduladas por patrones específicos de actividad neuronal. Los primeros estudios conductuales utilizando inhibidores de la síntesis proteica demostraron que la síntesis *de novo* de proteínas es requerida para la formación de memoria a largo término [100]. Este marco teórico fue expandido a nivel celular y molecular, donde se demostró que los procesos de plasticidad sináptica a largo término requieren de síntesis de ARN mensajero y proteínas [101]. Por lo tanto, la expresión génica que ocurre inmediatamente después de los eventos a ser almacenados, juega un papel crítico en el establecimiento y/o mantenimiento de cambios neuronales a largo término. Este grupo de genes inducibles son conocidos como genes tempranos inmediatos (IEGs, por sus siglas en inglés) [102, 103]. Los IEGs son genes de inducción rápida y transitoria, insensibles a inhibidores de síntesis proteica, descriptos en múltiples tipos celulares [104].

Los IEGs se pueden clasificar en: 1) “IEGs regulatorios”, que codifican para proteínas que pueden aumentar o disminuir la expresión de genes “río abajo” (por ejemplo *c-fos*, *c-jun*, y *zif268*) y 2) “IEGs efectores”, que codifican para proteínas que cumplen un rol funcional más directo en las sinapsis, como ser proteínas estructurales, proteínas transductoras de señales, factores de crecimiento, enzimas (por ejemplo Arc, Homer 1a, BDNF). Los productos proteicos de los genes reguladores se denominan factores de transcripción inducibles (ITFs, por sus siglas en inglés), para diferenciarlos de factores de transcripción constitutivos como CREB y Elk-1, que son regulados por modificaciones postraduccionales, como la fosforilación. Los IEGs, incluyendo los ITFs *c-fos* y *zif268*, son el primer grupo de genes que se expresan luego de la activación sináptica [105]. En particular, el gen de *c-fos* codifica para la proteína c-Fos, la cual se

dimeriza con proteínas de la familia Jun (c-Jun, Jun-B, Jun-D) para formar el factor de transcripción AP-1 que, a su vez, regula la expresión de varios genes efectores [106, 107]. La expresión rápida y transitoria de c-Fos está asociada a los eventos iniciales de la formación de la memoria en varias tareas de aprendizaje [105, 107-109] y el apagado del gen de *c-fos* o la inhibición de su expresión en el momento del entrenamiento interfiere con la formación de la memoria [109-111].

A pesar de que se desconoce en profundidad el rol de los genes tempranos inmediatos, el mapeo de la expresión de IEGs resulta una metodología muy utilizada para visualizar poblaciones neuronales activas en modelos animales. Estas técnicas han sido aplicadas para la identificación de regiones cerebrales relacionadas con el aprendizaje y memoria [112-114]. *c-fos* tiene un mayor umbral de inducción y su activación tiende a estar relacionada con paradigmas conductuales con una fuerte carga cognitiva y/o emocional. Por su parte, la expresión *zif268* es más característica de actividades sinápticas fisiológicas [115]. Se observó que mientras la evocación de una memoria espacial reciente activa al hipocampo y la corteza entorrinal, la evocación de una memoria remota está asociada a la activación (relacionada a la inducción de genes como *c-fos* y *zif268*) en zonas de la corteza prefrontal (CPF), cíngulo anterior, corteza retrosplenial (CRS) y corteza temporal [114]. Resultados similares fueron obtenidos para la evocación de una memoria asociativa de miedo [112]. En particular, trabajos recientes han revelado cambios en la expresión de c-Fos en la CRS luego de un condicionamiento clásico [116], y cambios de Zif268 y c-Fos en memoria de trabajo espacial [117].

Dentro del grupo de IEG efectores, *arc* ha sido uno de los más estudiados dada su participación directa en procesos de plasticidad sináptica asociada a experiencias conductuales [118, 119]. La proteína Arc se encuentra enriquecida en la densidad postsináptica, su expresión es altamente dinámica y se correlaciona con la activación neuronal [120]. El ARN mensajero de *arc* es transportado y expresado específicamente hacia dendritas que participan en sinapsis activas [121]. Se ha demostrado su capacidad de modificar las funciones sinápticas y su participación en procesos de plasticidad [122, 123]. Consistente con esto, Arc interactúa con endofilinas y dinaminas para regular el tráfico de receptores AMPA en la membrana de las neuronas [124].

En relación con el mapeo de la expresión de Arc, se observó que la exploración de ambientes novedosos induce una fuerte expresión de Arc en el hipocampo y en regiones neocorticales en roedores [120]. Trabajos recientes han demostrado que la inducción de Arc también se observa en regiones específicas del cerebro durante la performance de diferentes tareas conductuales asociadas a memoria espacial [125],

condicionamiento al miedo [126], memoria olfativa [127] y condicionamiento operante [128].

La posible participación de la proteína TDP-43 en plasticidad neuronal y en procesos cognitivos apenas ha sido investigada. Los escasos reportes que evalúan este tema incluyen: 1) la descripción de fallas en la potenciación de largo término (LTP, por sus siglas en inglés) y defectos en la memoria en un modelo de ratones transgénicos con sobreexpresión constitutiva de TDP-43 salvaje (TDP-43 WT) y 2) estudios *in vitro* sugiriendo que TDP-43 podría funcionar como un nuevo elemento implicado en la modulación de la plasticidad sináptica [95, 129]. TDP-43 participaría como un factor respondedor a la actividad neuronal, con un rol en la regulación del transporte y traducción local en las dendritas de ARN mensajeros luego de un estímulo neuronal, incluyendo ARNs requeridos para la reestructuración de las sinapsis como β-actina y CaMKIIα [130]. Sin embargo, los problemas asociados con los posibles cambios estructurales y funcionales en animales con sobreexpresión de TDP-43 desde el momento de la concepción (constitutivos), en el primer caso, y la limitada capacidad de extrapolar resultados generados *in vitro* mediante despolarización por KCl con la complejidad de los procesos en el cerebro intacto, en el segundo caso, indican que este aspecto de la biología de TDP-43 merece ser explorado con mayor profundidad.
Serán necesarios estudios adicionales para identificar las bases moleculares y celulares de la función de TDP-43 en la regulación de la plasticidad neuronal y las consecuencias de la alteración de sus funciones fisiológicas en pacientes con DFT y ELA.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Una característica común a muchas enfermedades neurodegenerativas es la acumulación patológica de agregados proteicos. En 2006, se produjo un profundo avance en este campo, debido a la identificación de la proteína **TDP-43** como el componente primario de las inclusiones intracelulares ubiquitinadas en la mayoría de los casos de **ELA** y **DFT**, dos procesos neurodegenerativos que actualmente no tienen cura conocida.

Así como los modelos celulares y animales aceleraron el ritmo del entendimiento de las enfermedades de Alzheimer, Parkinson, Huntington y Creutzfeldt-Jakob, el desarrollo de sistemas en ratones transgénicos es crítico para testear hipótesis y para dilucidar el rol de TDP-43 en las funciones fisiológicas celulares y en la patogénesis de la DFT y la ELA. Por otro lado, dado el virtual desconocimiento de las funciones fisiológicas de esta proteína, estos modelos experimentales también resultan vitales para descifrar si está involucrada en procesos homeostáticos.

Con el fin de **estudiar el rol patofisiológico de TDP-43 *in vivo***, utilizaremos un novedoso modelo de ratones transgénicos con expresión regulable de la proteína TDP-43 con localización citoplásmica (TDP-43-ΔNLS).

Objetivo general:

Establecer el rol de la proteína TDP-43 en procesos fisiológicos y patológicos, a través de la caracterización de un nuevo modelo animal (ratones transgénicos).

Se propone ahondar en el estudio de la fisiología de TDP-43 como un paso esencial en la comprensión de los cambios patológicos observados en ciertas enfermedades humanas. En particular, el análisis de TDP-43 en cuanto a la regulación de su **localización subcelular** (transporte núcleo-citoplasma), su rol en procesos **conductuales**, de **plasticidad sináptica y memoria,** resultan indispensables para comprender la patofisiología de dicha proteína.

En base a lo antedicho, nuestras **Hipótesis de trabajo** postulan que 1) TDP-43 es una proteína que se halla altamente regulada en cuanto a sus niveles de expresión y localización subcelular, cuyas funciones normales son necesarias para la sobrevida neuronal. 2) La modificación de los niveles y/o compartimentalización celular de TDP-43 puede llevar a una alteración en sus funciones fisiológicas concomitante con la generación de roles patológicos por mecanismos de pérdida o ganancia de función.

Objetivos específicos:

1. Determinar si la sobreexpresión de TDP-43 mutante con localización citoplasmática (TDP-43-ΔNLS) lleva a alteraciones conductuales en ratones transgénicos para TDP-43.

Utilizando ratones transgénicos con expresión regulable (vía el sistema CaMKII α/tet-O) de TDP-43-ΔNLS (mutante exclusivamente citoplásmica), se propone evaluar *in vivo* si la sobreexpresión condicional de hTDP-43-ΔNLS en el cerebro anterior lleva a déficits motores, cognitivos y sociales asociadas a la patología de DFT y ELA. De este modo, se aspira a establecer modelos animales útiles para efectuar estudios mecanísticos.

2. Analizar la reversibilidad de las alteraciones conductuales mediante estudios de supresión en la expresión del transgén en animales jóvenes y adultos.

Actualmente, no existen terapias efectivas que modifiquen el curso de las proteinopatías de TDP-43. Se desconoce si el desarrollo de terapias dirigidas hacia TDP-43 podrían inhibir el proceso neurodegenerativo y revertir las anormalidades conductuales. Se propone determinar si el apagado del transgén podría mejorar la sintomatología conductual en nuestro modelo.

3. Estudiar la expresión y activación de genes relacionados con fenómenos de plasticidad sináptica y evaluar si estos estarían asociados con los cambios conductuales observados.

Como un estudio de las bases moleculares y celulares del efecto de la sobreexpresión de hTDP-43-ΔNLS en los cambios conductuales y principalmente en las funciones cognitivas, se propone analizar los niveles de expresión y/o activación de varios marcadores moleculares asociados a plasticidad neuronal.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Generación y mantenimiento de los animales transgénicos

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron ratones transgénicos con expresión regulable de la proteína TDP-43 humana modificada para su relocalización citoplasmática (hTDP-43-ΔNLS), los cuales han sido previamente generados por Igaz y colaboradores [77]. Brevemente, el cDNA codificante para la proteína TDP-43 humana (número de acceso NM 007375) fue obtenido en el plásmido pENTR-221 (Invitrogen). Para lograr la localización citoplasmática de la proteína se realizaron mutaciones con cambio de sentido dirigidas a la secuencia de localización nuclear (NLS, por sus siglas en inglés) [16]. Los intentos iniciales de generar ratones con expresión constitutiva de TDP-43 demostraron que los mismos presentan letalidad prenatal, por lo cual se utilizó un sistema de regulación espacio-temporal de la expresión del transgén. Para ello se usó el sistema CaMKIIα tet-P [131]. El promotor CaMKIIα dirige la expresión en neuronas mayoritariamente del cerebro anterior y permite la expresión regulada del transgén en regiones restringidas del cerebro al ser usado en combinación con el transactivador de tetraciclina (tTA) [132].

Las líneas transgénicas fueron generadas en la Universidad de Pensilvania (EEUU) a través de la inyección del vector moPrP-tetP-hTDP-43-ΔNLS linealizado en pronúcleos de huevos fertilizados obtenidos de la cruza entre ratones C57BL/6J × C3HeJ [77]. Ratones monogénicos fundadores tetP-hTDP-43-ΔNLS fueron cruzados con ratones que expresan el tTA bajo el control del promotor CaMKIIα (CaMKIIα-tTA), [131; Jackson Laboratory] generando de esta forma: ratones no transgénicos (nTg), ratones monogénicos CaMKIIα-tTA (tTA) y ratones monogénicos tetP-hTDP-43-ΔNLS (ΔNLS). Estos tres grupos fueron considerados ratones control ya que no expresan la proteína transgénica TDP-43. El cuarto y último tipo de animales obtenidos fueron los ratones bigénicos CaMKIIα-tTA/tetP-hTDP-43-ΔNLS (tTA/ΔNLS). Entre paréntesis se indica la abreviatura que se utilizará en esta tesis para facilitar la nomenclatura de los distintos genotipos *(Figura 11).*

Esta línea transgénica fue establecida por retrocruza con ratones C57BL/6J por 6-7 generaciones para homogeneizar el background genético, dado que proviene de la cruza de dos cepas diferentes. Para cada uno de los grupos estudiados en todos los experimentos realizados se utilizaron animales bigénicos y controles de ambos sexos. El protocolo experimental para este estudio fue aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires.

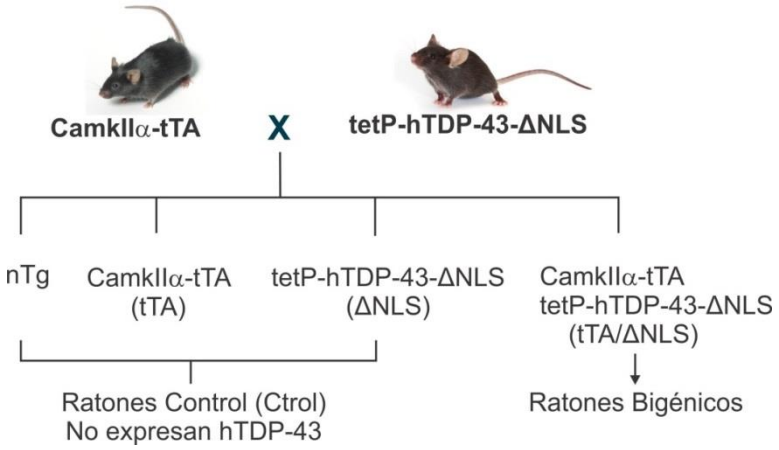

Figura 11: Cruzamientos de líneas transgénicas murinas.
Detalle del cruzamiento realizado para la obtención de los ratones bigénicos experimentales (tTA/ΔNLS). Los animales utilizados como control (Ctrol) nTg, tTA y ΔNLS no expresan el transgén hTDP-43-ΔNLS.

1.1 Administración de Doxiciclina (Dox)

Para evitar defectos en el desarrollo pre y postnatal a causa de la expresión del transgén, los animales reproductores y sus crías fueron tratados con 0,2 mg/ml de Doxiciclina (Dox, Doxycycline Hyclate, sc-204734A, Santa Cruz Biotechnology) en el agua para bebida. Esta droga se une a la proteína tTA e inhibe su capacidad de activar la transcripción a través de un promotor que contiene la secuencia tetP, en lo que se conoce como un sistema “tet-off”, ya que se propicia la transcripción en *ausencia* de Dox (*Figura 12A*). La expresión del transgén fue activada al destete (día 28 postnatal) removiendo la Dox del agua y los animales fueron analizados a diferentes tiempos (*Figura 12B*). Para los experimentos de supresión, los ratones fueron tratados nuevamente con Dox 0,2 mg/ml por los tiempos indicados.

1.2 Genotipado

Las crías de cada apareo fueron genotipadas para determinar la presencia de cada transgén. Para ello, se obtuvieron muestras de ADN genómico extraído a partir de biopsias de la extremidad de la cola (5 mm) o de la oreja y se realizó una amplificación por PCR para detectar las secuencias transgénicas. Para la extracción, el tejido fue calentado a 95°C por 1 hora en 200 µl de NaOH 50mM, luego neutralizado con 20 µl de Tris-HCl 1M (pH8) y vortexeado. Posteriormente, se realizó un centrifugado a 7.000 rpm por 3 min y se utilizó 1 µl del sobrenadante para cada reacción de amplificación.

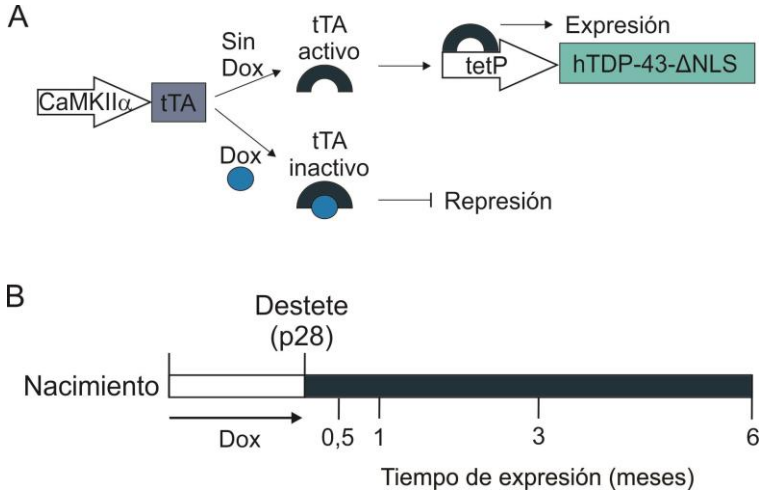

Figura 12: Regulación de la expresión de hTDP-43-ΔNLS.
A. Representación esquemática de la expresión de hTDP-43-ΔNLS regulada por doxiciclina (Dox) bajo el control del promotor CaMKIIα en ratones bigénicos. La Dox inhibe la unión del transactivador tTA al promotor respondedor de tetraciclina, reprimiendo la expresión de hTDP-43ΔNLS. B. Diseño experimental: la expresión del transgén fue activada al destete (p28) por remoción de Dox del agua. Las respuestas conductuales en los ratones bigénicos fueron analizadas a distintos tiempos post- inducción.

Para la reacción de amplificación del transgén hTDP-43-ΔNLS (ver primers, *Tabla 3*) las muestras se corrieron por 36 ciclos a 94°C por 1 min, 58°C por 1 min y 72°C por 1 min, con una desnaturalización inicial de 10 min a 94°C y una elongación final de 10 min a 72°C. Para la detección de transgén CaMKIIα-tTA (ver primers, *Tabla 3*) la reacción de amplificación fue de 30 ciclos a 94°C por 1 min, 56°C por 1 min y 72°C por 1 min, con una desnaturalización inicial de 10 min a 94°C y una elongación final de 10 min a 72°C.

Primers		Secuencia (5´- 3´)	Longitud del producto (pb)
tetP-hTDP-43-ΔNLS	Sentido	TTGGTAATAGCAGAGGGGGTGGAG	350
	Anti-sentido	TCCCCCAGCCTAGACCACGAGAAT	
CaMKIIα-tTA	Sentido	CGCTGTGGGGCATTTTACTTTAG	400
	Anti-sentido	CATGTCCAGATCGAAATCGTC	

Tabla 3: Secuencia de primers utilizados para el genotipado de ratones

2. Protocolo de supresión del transgén

Los ratones mantenidos en presencia de 0,2 mg/ml de Dox hasta el día 28 postnatal fueron tratados nuevamente con Dox a los 0,5 meses [ratones (sup)-1m] o 5,5 meses [ratones (sup)-6m] luego del destete para suprimir la expresión del transgén durante 2 semanas, y fueron analizados 1 mes (*Figura 13A*) o 6 meses (*Figura 13B*) postdestete, respectivamente. Los resultados obtenidos de estos animales suprimidos fueron comparados con ratones en los que la expresión del transgén se mantuvo durante 1 mes (ratones **1m**) o 6 meses (ratones **6m**) luego del destete.

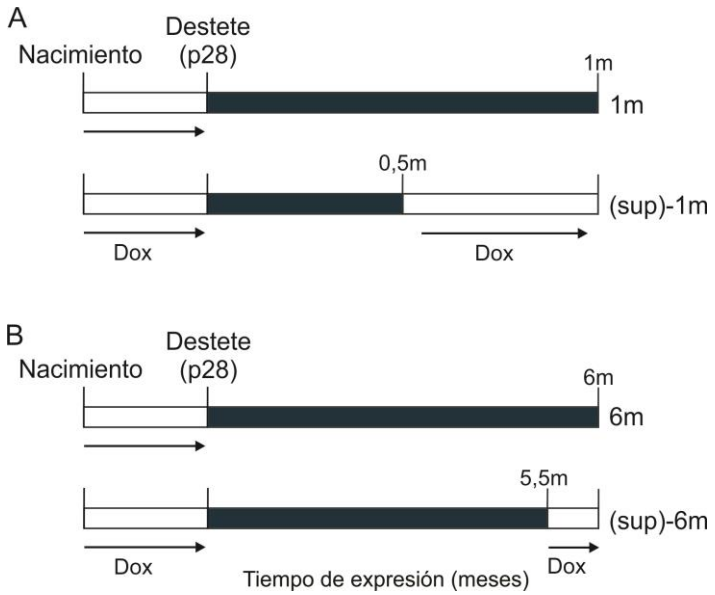

Figura 13: Protocolo utilizado para los experimentos de supresión del transgén.
Nota: los gráficos en A y B no están a escala entre sí.

3. Estudios Conductuales

Los ratones (machos y hembras) fueron mantenidos en un ciclo luz/oscuridad de 12 h/12 h, con acceso *ad libitum* al agua y comida. Todos los tests conductuales, con excepción de la tarea de alternancia espontánea en el laberinto en Y, fueron realizados durante la fase de luz. Todos los animales fueron habituados en el cuarto experimental durante al menos 1 hora antes de cada test (condiciones atenuadas de luz y sonido). Todos los laberintos y objetos utilizados durante el estudio conductual fueron limpiados con etanol 10% entre cada sesión.

Dado que todos los ratones no bigénicos (ratones nTg y ambos genotipos monogénicos) exhibieron una respuesta conductual similar (no se encontraron diferencias significativas), agrupamos estos genotipos en el grupo Control (Ctrol) para

las comparaciones con los ratones bigénicos en los tests conductuales realizados y otros análisis experimentales.

3.1 Test de campo abierto

La medida más estandarizada para evaluar la actividad locomotora en un animal consiste en cuantificar la actividad espontánea en un ambiente novedoso. Por esta razón para la evaluación general de la locomoción y de la actividad exploratoria se utilizó el test de campo abierto. Los ratones (previamente habituados al cuarto conductual) fueron colocados en una caja de Plexiglás (40 x 40 x 40 cm) de suelo blanco (ambiente novedoso), la cual se divide en dos zonas: periferia y centro (este último comprende el 50% de la superficie total) (*Figura 14*). La actividad del animal se registró durante 20 min con una cámara montada arriba del campo y conectada a una computadora. Para la determinación automática de la posición de cada ratón durante el test se utilizó el sistema de seguimiento (*tracking*) de video *ANY-maze* (Stoelting Co). La iluminación de la habitación se mantuvo a 50 lux. Se registró y analizó la distancia total y la distancia centro (en zona central) recorrida por cada ratón. También se realizó un análisis de la distancia total en segmentos de tiempo (cada 5 min) para poder evidenciar patrones de habituación al ambiente novedoso durante el test.

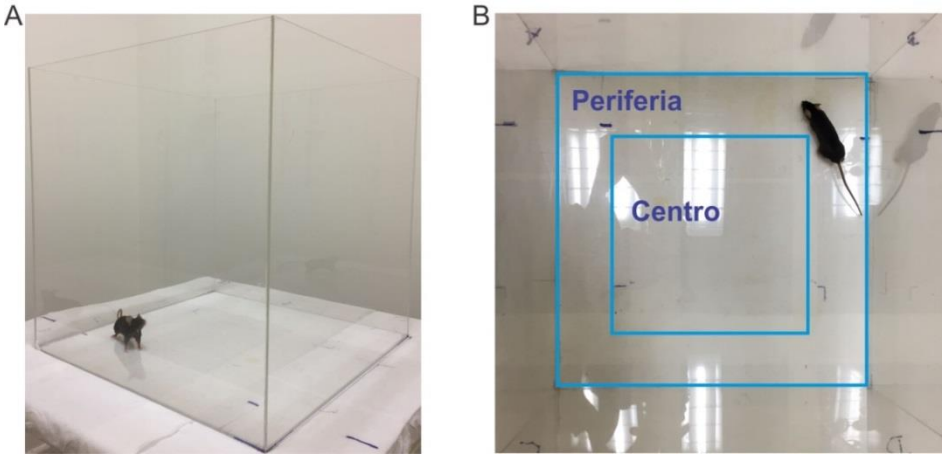

Figura 14: Test de campo abierto.
A. Fotografía lateral de la caja de Plexiglás utilizada como ambiente novedoso durante la realización del test de campo abierto. B. Vista superior del test durante el registro, se muestra la división de las zonas determinadas como periferia y centro.

3.2 Rotarod

El balance y la coordinación motora de los ratones fueron analizados mediante su desempeño en el dispositivo denominado rotarod (modelo 7600, Ugo Basile Instruments). El rotarod consta de un cilindro de 3 cm de diámetro, el cual rota durante el test. El mismo está dividido en 5 partes, formando 5 cámaras disponibles para realizar el test (5 ratones en simultáneo, ver *Figura 15*). En la base de cada cámara se encuentra un sensor de caída, el cual al ser presionado por el ratón detiene el temporizador, midiéndose la latencia de la caída desde el inicio del test. En una sesión de rotarod, el ratón es colocado sobre el cilindro y debe caminar constantemente hacia adelante para evitar caer del mismo. La altura desde el cilindro a la base del aparato está diseñada de tal manera que los animales opten por caminar hacia adelante en lugar de dejarse caer, pero no resulta lo suficientemente alta como para que el ratón se lastime cuando cae [133]. El test se realizó con dos configuraciones: velocidad constante y acelerado.

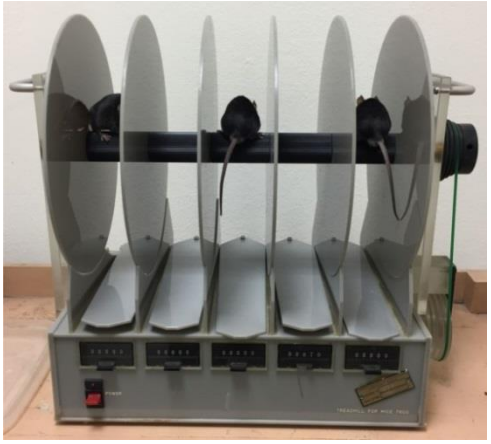

Figura 15: Equipo rotarod para medir balance y coordinación.
Rotarod modelo 7600, Ugo Basile Instruments, utilizado para el test en sus versiones a velocidad constante y acelerado.

En la modalidad de velocidad constante (17 revoluciones por minuto, rpm), a cada ratón se le administraron 1 o 2 sesiones de práctica y luego fueron colocados nuevamente en el cilindro rotatorio para el test. Se utilizó un tiempo de corte de 3 minutos. La latencia de caída fue registrada como parámetro de desempeño. Para la versión acelerada del test los ratones fueron colocados en el cilindro, comenzando con una velocidad rotatoria lenta (4 rpm), hasta llegar a un máximo de 40 rpm durante una sesión de 5 minutos. En este caso la latencia de caída resulta una medida más estricta

de la habilidad de mantener el balance, ya que los requerimientos para correr hacia adelante aumentan gradualmente. Para cada ratón se realizaron 4 ensayos durante el test con un intervalo de 2 minutos entre ensayos y se registró la latencia de caída en cada ensayo. Aquellos eventos en que el ratón gira de forma pasiva sobre el cilindro (agarrado al cilindro sin correr) fueron considerados como caída.

3.3 Fenotipo de Clasping

El fenotipo motor denominado “clasping” refleja un componente de espasticidad [77] en el cual se observa una respuesta anormal de los miembros del animal cuando son suspendidos por su cola. Mientras que la respuesta motora típica de un ratón cuando se lo sostiene por su cola, es la extensión de sus miembros traseros, los ratones que presentan clasping contraen anormalmente sus patas hacia el tronco. Para la realización del test, los ratones fueron suspendidos por la cola a 30 cm de altura sobre una caja con lecho durante 30 segundos y luego bajados lentamente hasta el fondo de la jaula. Se consideró un fenotipo de clasping positivo en aquellos ratones que contrajeron sus miembros hacia el tronco durante 3 segundos y mantuvieron su postura hasta que fueron bajados en la caja. Se registró presencia o ausencia de fenotipo de clasping.

3.4 Reconocimiento de objeto novedoso

El reconocimiento de objeto novedoso es un test ampliamente utilizado para estudiar memoria en roedores. No requiere un entrenamiento exhaustivo previo y se puede realizar en una sola sesión [134]. En este test se expone al ratón ante un objeto familiar (previamente explorado) y uno novedoso. El reconocimiento de un objeto se evidencia como mayor tiempo de exploración del objeto novedoso y se basa en la propia tendencia natural del roedor de acercarse y explorar la novedad. Esta preferencia por el objeto novedoso es considerada como una indicación de que ya existe en la memoria una representación del objeto familiar. Esta prueba depende en gran medida de la función cortical.

Antes de realizar el test, cada ratón fue habituado al contexto (caja de Plexiglás de 40 x 23 x 15 cm) por dos días consecutivos. En el primer día se realizó una sesión de habituación de 10 min y en el segundo día dos sesiones de 5 min. Al tercer día (entrenamiento) los ratones fueron colocados en el mismo contexto y expuestos a dos objetos idénticos en extremos opuestos de la caja durante 10 min. El test de retención se realizó 24 h luego del entrenamiento, donde a cada animal se le permitió explorar

una copia del objeto presentado previamente (familiar) y un nuevo objeto (novedoso) por 5 min *(Figura 16)*. Todas las sesiones fueron grabadas por una cámara montada arriba de la caja. La "exploración del objeto" fue estandarizada como la cabeza del animal apuntando hacia el objeto a una distancia no más de 2 cm, con el cuello extendido y moviendo las vibrisas. Los objetos no tenían ninguna relevancia natural para los ratones y nunca fueron usados previamente asociados a una recompensa. El recorrido cerca de los objetos y sentarse sobre los mismos no fue considerado como conducta exploratoria. Se registraron tiempos de exploración absolutos de cada objeto y se calculó el índice de preferencia que representa el tiempo de exploración de un objeto (novedoso o familiar) respecto del total de tiempo explorado (familiar + novedoso).

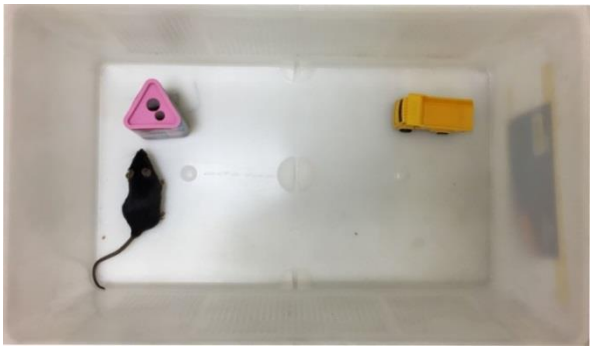

Figura 16: Test de reconocimiento de objeto novedoso.
Durante la fase de retención se expone al ratón a un objeto novedoso y a un objeto familiar. En la fotografía se puede observar al animal mostrando una conducta exploratoria hacia el objeto de la izquierda.

3.5 Test de evitación inhibitoria pasiva

El paradigma de evitación inhibitoria pasiva se usa tradicionalmente como una manera rápida y fácil de explorar la memoria a corto y a largo plazo, una prueba cognitiva que tiene la ventaja adicional de ser un paradigma de aprendizaje asociativo motivado por el miedo adquirido en una sola sesión de entrenamiento. Este test se basa en la preferencia innata del roedor por las zonas oscuras y la aversión por zonas iluminadas. El dispositivo utilizado para esta prueba consta de un compartimento oscuro de Plexiglás (20 x 20 x 15 cm) con un piso enrejado de acero inoxidable conectado a una fuente de poder y un compartimento iluminado adyacente a la entrada de la cámara oscura *(Figura 17).*

Durante la fase de adquisición/condicionamiento (entrenamiento), cada ratón se colocó en la zona iluminada y recibió una descarga plantar (estímulo aversivo) inmediatamente después de entrar al compartimento oscuro (0,8 mA, 50 Hz, 1 seg) [135]. Se registró la latencia de entrada. Los ensayos de retención se realizaron 1,5 h (memoria a corto término) o 48 h (memoria a largo término) más tarde. En la prueba de retención se evaluó la respuesta de evitación del evento aversivo posicionando nuevamente al animal en la zona iluminada y registrando la latencia de entrada a la cámara oscura con un tiempo de corte de 300 seg por sesión. Se espera que a mayor latencia de entrada mayor es la asociación de la cámara con el estímulo aversivo y, por lo tanto, mayor memoria. Durante los ensayos de retención la descarga plantar fue omitida.

Figura 17: **Test de evitación inhibitoria pasiva**.
Fotografía del dispositivo utilizado para la realización del test.

3.6 Alternancia espontánea en el laberinto en forma de Y

Para la evaluación de la memoria de trabajo se utilizó la prueba de alternancia espontánea en el laberinto en forma de Y, que depende principalmente de la corteza prefrontal y del hipocampo dada su naturaleza de tarea espacial. Esta prueba se basa en la preferencia del animal para investigar un nuevo brazo del laberinto en lugar de volver a un brazo visitado previamente y está relacionado con el comportamiento natural del animal de explorar nuevos lugares para aumentar las probabilidades de encontrar recursos. El laberinto consistió en 3 brazos iguales de Plexiglás transparente (43 x 4 x 12,5 cm) colocados entre sí con un ángulo de 120° en forma de Y *(Figura 18)* [136]. Se colocaron claves visuales fijas en las paredes del cuarto para facilitar la orientación espacial de animal.

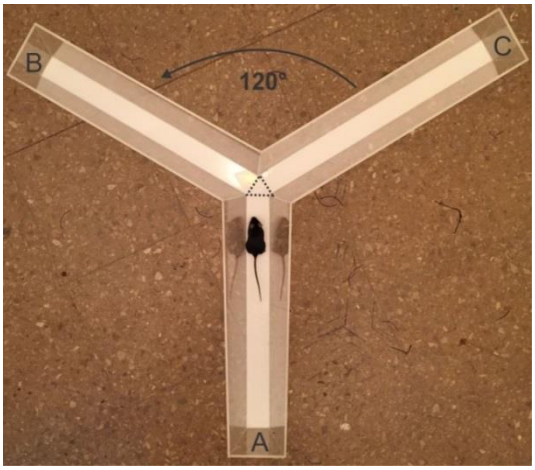

Figura 18: Laberinto en forma de Y.
En el inicio del test cada ratón es colocado al final de uno de los brazos y se observa durante 8 min mientras explora el laberinto libremente. El orden de los brazos visitados (A, B o C) es registrado para el análisis de la alternancia espontánea.

Cada ratón fue colocado al final de un brazo, mirando hacia el centro y se lo dejó explorar el laberinto libremente por 8 min sin ningún tipo de entrenamiento, recompensa o castigo. Todas las sesiones fueron grabadas por una cámara montada sobre el laberinto y la posición del ratón fue determinada automáticamente, utilizando el sistema de *video tracking ANY-maze* (Stoelting Co). La iluminación de la habitación se mantuvo constante a 30 lux. Las entradas a cada brazo (denominados A, B y C) fueron anotadas por el investigador. Estas entradas fueron analizadas por tripletes consecutivos y una alternancia positiva se definió como un ciclo completo de entradas en cada uno de los 3 brazos sin repetición (Por ejemplo: ABC, BCA, CAB, ACB, etc.). El porcentaje de alternancia espontánea se calculó como el número de alternancias positivas dividido el número de alternancias totales [(# alternancias positivas/ # entradas totales – 2) x 100]. El número de entradas totales a los brazos durante el test se utilizó como índice de actividad ambulatoria y se excluyeron aquellos ratones con un número de entradas totales menor a 12. Todas las pruebas de laberinto en forma de Y se llevaron a cabo durante el inicio de la fase oscura (18 a 21 h) para maximizar el comportamiento exploratorio.

3.7 Test de Interacción Social

El test de interacción social es una prueba que permite determinar la afiliación/motivación social del ratón experimental frente al encuentro indirecto con otro ratón no familiar. La caja utilizada para la realización de esta prueba consistió en una

caja rectangular de Plexiglás negro (40,6 x 15 x 23 cm) dividida en 3 cámaras interconectadas (*Figura 19*). Antes del comienzo de cada prueba una de las cámaras de los extremos se designó al azar como “no social” y su contraparte como “social”, dejando libre la cámara central. Durante la fase de habituación se colocó un cilindro de Plexiglás transparente cubierto de pequeños orificios (7 cm de diámetro y 14 cm de altura) en cada una de las cámaras de los extremos. Los pequeños orificios del cilindro permiten la interacción olfativa, auditiva y visual entre los animales. Los ratones experimentales fueron colocados en la cámara central y se los dejó explorar la caja durante 5 min. Inmediatamente luego de la habituación, se colocó un ratón (estímulo social: macho C57BL/6 de 21 a 28 días de edad) dentro del cilindro del lado designado como social y un objeto de plástico (similar a un ratón en color y tamaño: estímulo no social) dentro del cilindro del lado no social y se le permitió al ratón experimental explorar libremente la caja durante 10 min [137, 138]. El principio fundamental de esta prueba se basa en la libre elección que tiene el ratón en pasar tiempo en cualquiera de las tres cámaras de la caja experimental. La sociabilidad en este caso está definida como la tendencia del animal a pasar más tiempo con otro ratón en lugar de pasar tiempo solo o interactuando con un objeto inanimado. Se registraron los tiempos olfateando los estímulos social y no social, como así también los tiempos de permanencia en cada cámara. Todas las sesiones fueron grabadas por una cámara montada encima de la caja experimental. Durante la prueba se cubrió el piso de la caja con viruta, la cual fue cambiada entre cada ratón experimental. Se utilizaron condiciones de iluminación constante (25 lux).

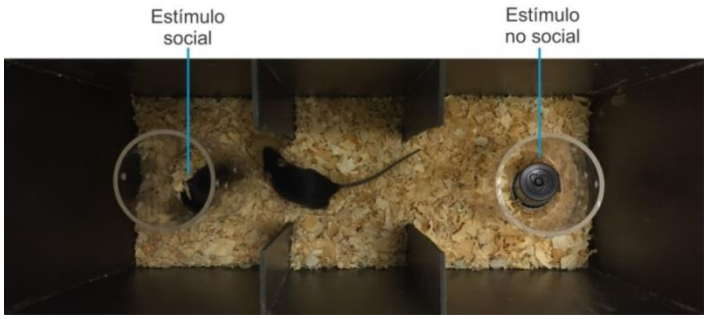

Figura 19: Test de Interacción Social.
Durante la evaluación de la interacción social, cada ratón experimental es expuesto a un estímulo social (macho C57BL/6 de 21 a 28 días de edad) y un estímulo no social, y se registra durante 10 min los tiempos de interacción (olfación) con cada estímulo.

3.8 Test de olfato: habituación/deshabituación

El olfato es el sentido más desarrollado en los roedores. Los ratones utilizan el olfato para detectar comida, predadores, marcas territoriales, olores de la colonia, receptividad sexual, dominancia social y muchos otros aspectos del ambiente en el que se encuentran. Dado que la performance de los animales estudiados en algunos de los tests realizados depende críticamente del sentido del olfato y que, a su vez, el promotor CaMKII utilizado dirige la expresión del transgén también en el bulbo olfatorio, se decidió evaluar la capacidad olfatoria en estos animales. Para dicho propósito se utilizó un test de habituación/deshabituación a distintos odorantes novedosos.

Este test nos permitió estudiar la agudeza olfatoria de los animales. Como se describió previamente [136], cada ratón se transfirió individualmente a una jaula con viruta limpia 30 min antes de iniciar el test para habituación. Se utilizaron hisopos para presentar los olores, cada uno fue impregnado con un odorante e inmediatamente presentado al animal. Para cada ratón se presentaron 5 olores diferentes en el siguiente orden: agua de la canilla, extracto de almendra (1:300), extracto de banana (1:300), raspado de una jaula de plástico en la cual vivieron 5 machos durante 6 días y raspado de una jaula de plástico en la cual vivieron 5 hembras durante 6 días. Durante el test, cada olor se presentó 3 veces de forma consecutiva durante 2 min antes de pasar al olor siguiente. De esta forma, si la agudeza olfativa de los ratones se encuentra intacta, se espera que al presentar un olor, el ratón tenga una respuesta olfativa alta y esta vaya disminuyendo a medida que se repiten las presentaciones del mismo olor (habituación) y luego, cuando se presenta un nuevo olor, la respuesta vuelva a aumentar (deshabituación).

En cada presentación del mismo olor se utilizó un nuevo hisopo. Toda la sesión fue grabada y se registró el tiempo en que el animal estuvo olfateando cada hisopo. Las pruebas se realizaron con una iluminación constante de 30 lux.

3.9 Test de percepción visual

Para el estudio de la agudeza visual en lo ratones se utilizaron dos tareas, el test del precipicio visual [136, 139] y la respuesta de posicionamiento visual [140]. En el test del precipicio visual se utilizó una caja con una cornisa o precipicio simulado. Para lograr dicho efecto se utilizó una caja de Plexiglás con una plataforma de 30 x 30 cm, luego una caída (precipicio) de 60 cm de altura y una base del precipicio de 30 x 15 cm (*Figura 20*). Tanto la superficie de la plataforma como la caída y la base fueron

recubiertas con un papel de patrón cuadriculado blanco y negro (2,5 x 2,5 cm) para enfatizar el efecto visual de profundidad. Una placa de Plexiglás transparente se utilizó para cubrir la plataforma y todo el precipicio de forma tal de generar el efecto visual de precipicio. Para realizar el test se colocó a cada ratón en el borde izquierdo de la plataforma más alejado del borde de la cornisa, mirando hacia la pared de la caja, y se lo dejó explorar el contexto libremente. El comportamiento fue considerado positivo cuando el ratón se detuvo en su marcha al enfrentarse al precipicio virtual antes de cruzarlo. Aquellos ratones cuya visión se encuentra disminuida caminan directamente sobre el Plexiglás transparente sin detenerse en ningún momento. El porcentaje de animales que frenó su marcha en el borde de la cornisa fue cuantificado. Cada animal fue testeado solo una vez.

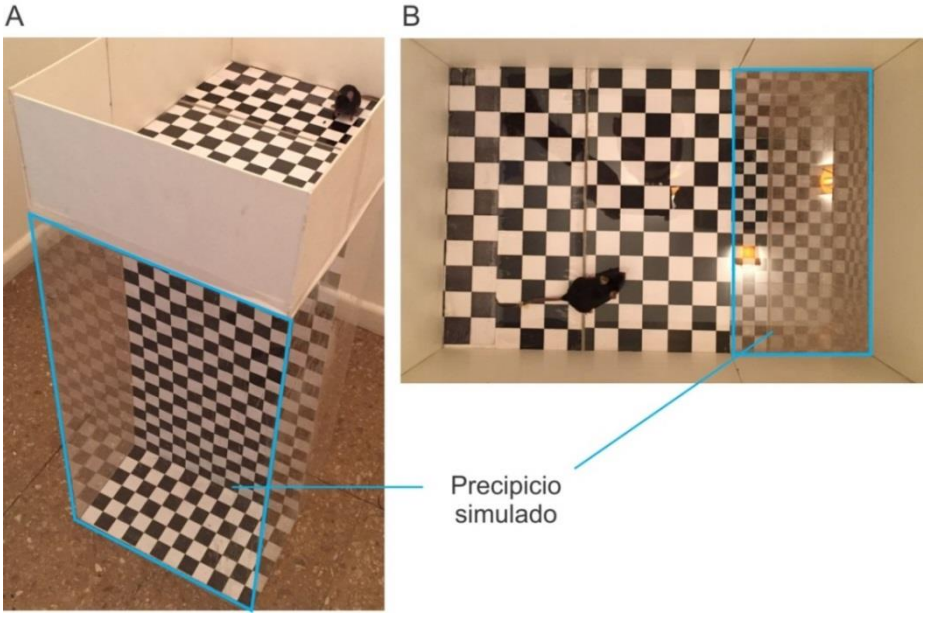

Figura 20: Precipicio visual.

A. Vista vertical de la caja utilizada para evaluar la percepción visual por medio del test de precipicio visual. B. Vista superior durante la realización del test. Una placa de Plexiglás transparente cubre la plataforma y todo el precipicio de forma tal de generar el efecto visual de precipicio. Si el ratón es capaz de ver, frenará en la cornisa y explorará los bordes. Si un animal presenta alteraciones en la percepción visual, no es capaz de ver la ilusión de la caída y sigue caminando por el precipicio simulado sin detenerse.

Para el estudio de la respuesta al posicionamiento visual, cada ratón fue suspendido de la cola a una altura de 40 cm y luego se lo hizo descender lentamente hacia una superficie sólida evitando cualquier tipo de contacto con las vibrisas del animal. A medida que la cabeza del animal se acerca a la superficie, los ratones

tienden a extender sus patas delanteras hacia la superficie para lograr un descenso seguro. Aquellos ratones con visión disminuida no logran ver la superficie acercándose y, por lo tanto, no extienden las patas. La respuesta promedio fue valorada en 1 ensayo por animal con el siguiente sistema de puntuación: 0. Ausencia de respuesta de posicionamiento (extensión de las patas), 1. Respuesta débil, 2. Clara respuesta de extensión de las patas. Para ambos tests realizados las vibrisas fueron recortadas en cada animal para eliminar respuestas asociadas al tacto y no a la visión. Por este motivo, estos tests visuales se realizaron al final de la batería de ensayos conductuales.

3.10 Test de auto-acicalamiento

Dado que la presencia de conductas repetitivas son comunes en pacientes con proteinopatías de TDP-43 (incluyendo demencia frontotemporal), se decidió estudiar este tipo de conductas en los ratones transgénicos. Para esto utilizamos el test de auto-acicalamiento, una prueba muy utilizada para evaluar modelos animales de autismo [141]. La prueba fue realizada en una caja de Plexiglás transparente de 26 x 16 x 14,5 cm. Cada animal fue colocado en la caja novedosa y se grabó toda la actividad utilizando una cámara montada arriba de la caja. Se registró en cada animal el tiempo acumulado de auto-acicalamiento durante una sesión de 15 min.

3.11 Prueba de agarre

Las anormalidades neuromusculares en un ratón pueden detectarse con simples mediciones de fuerza motora. La prueba de agarre en una malla de alambre permite evaluar el balance y la fuerza de agarre de un ratón para mantener su cuerpo suspendido [133]. Para esta prueba se utilizó una malla de alambre recubierta en su perímetro con cinta de enmascarar para evitar que los ratones caminen por el borde de la misma. El test se realizó colocando el ratón sobre la malla de alambre, luego se sacudió levemente 3 veces para estimular al animal a agarrarse a los alambres y luego se giró completamente con la superficie de agarre hacia abajo, de tal forma que el ratón debe estar fuertemente agarrado para mantener su cuerpo suspendido. La malla fue colocada a una altura de 20 cm por encima de una caja con viruta limpia. Se cuantificó la latencia de caída de cada ratón de la malla de alambre. Se utilizó un tiempo de corte de 60 seg.

Figura 21: Prueba de agarre.
Evaluación de la fuerza de agarre de un ratón Control para mantener su cuerpo suspendido durante 60 segundos.

4. Preparación del tejido cerebral

Para la recolección de tejido cerebral los ratones fueron anestesiados con hidrato de cloral 5% (1 ml/30 g) y luego se realizó perfusión transcardíaca con PBS frío (0,1M; pH 7,4) suplementado con 10U/ml de heparina. Los cerebros fueron extraídos inmediatamente y cortados de forma sagital separando los dos hemisferios. Un hemisferio fue fijado durante 24 h en paraformaldehido 4%, crioprotegido en soluciones de sacarosa de concentración creciente (10% y 30% en PBS 0,1 M durante 24 h cada una) y guardados para los ensayos de inmunofluorescencia. El otro hemicerebro fue diseccionado en corteza cerebral, hipocampo, cerebelo, bulbo olfatorio y resto de tejido (estructuras subcorticales y tallo cerebral), luego estos congelados inmediatamente en hielo seco y guardados a -80°C para el posterior análisis bioquímico y mediciones de peso.

5. Anticuerpos

Los anticuerpos primarios utilizados en este trabajo fueron los siguientes: anticuerpo policlonal anti-TDP-43 hecho en conejo dirigido contra la porción C-terminal de la proteína, aminoácidos 394-414 (C-t TDP-43 pAb), descripto previamente [71]. Anticuerpo monoclonal de ratón específico contra la proteína TDP-43 humana (anti-hTDP-43), dirigido contra los aminoácidos 1-260 (60019-2; Proteintech). Anticuerpo monoclonal de ratón anti-NeuN (Bioscience Research Reagents), utilizado como marcador de células neuronales. Anticuerpo policlonal de conejo anti-Zif268 (anti-Erg-

1, Santa Cruz Biotechnology). Anticuerpo policlonal hecho en conejo anti-c-Fos (Santa Cruz Biotechnology). Anticuerpo policlonal anti-Arc hecho en conejo (Synaptic systems). Anticuerpo monoclonal anti-GAPDH hecho en ratón (6C5; Advanced ImmunoChemical) y anticuerpo monoclonal anti-beta tubulina (Clon E7, Developmental Study Hybridoma Bank) utilizados como control de carga en los ensayos de Western Blot.

Como anticuerpos secundarios se utilizaron: anti-conejo Alexa Flour 488 (Invitrogen), anti-ratón rodamina (Jackson ImmunoResearch), anti-ratón y anti-conejo conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch).

6. Inmunofluorescencia

Los hemicerebros fijados y congelados a -80°C fueron cortados en rodajas (30-50 µm, cortes coronales), utilizando un micrótomo de deslizamiento (SM 2010R; Leica) y conservados a -20°C en solución crioprotectora hasta su utilización (50% glicerol, 50% PBS). Al momento de su uso, los cortes seleccionados fueron lavados en PBS (0,01M), permeabilizados con Triton X-100 1% en PBS por 1 h, bloqueados durante 1 h con Triton X-100 0,3% y suero de cabra al 5% en PBS e incubados overnight con el anticuerpo primario (diluido en Triton X-100 0,3%, suero de cabra 3% en PBS) a 4°C en las diluciones indicadas: anti-TDP-43 1:30000, anti-hTDP-43 1:10000 y anti NeuN 1:1000, anti-Zif268 1:1000, anti-c-Fos 1:1000, anti-Arc 1:1000. Posteriormente, se realizaron lavados con PBS-T (0,04% Triton X-100 en PBS) y se incubó en presencia de los anticuerpos secundarios conjugados con Alexa Fluor 488 1:500 (Invitrogen) y rodamina 1:500 (Jackson Laboratories) diluidos en Triton X-100 0,3% y suero de cabra al 5% en PBS durante 4 h a temperatura ambiente con agitación. La contra-tinción se realizó incubando en Hoechst 33342 (2 µg/ml) por 30 min. Los cortes fueron montados en portaobjetos gelatinizados, utilizando glicerol 30% en PBS 0,1M como medio de montaje. Las imágenes fueron capturadas con una cámara Olympus DP71 conectada a un microscopio Olympus IX-81 o a un microscopio confocal Olympus FV1000, utilizando el software Fluoview 2.1. Todas las imágenes mostradas en el trabajo son representativas de las poblaciones celulares.

7. Cuantificación celular y medición de grosor de regiones cerebrales

Cortes coronales de cerebro fueron inmunomarcados con el anticuerpo anti-NeuN para la detección de células neuronales. Se tomaron imágenes digitales de distintas regiones de interés a 4x y 40x, utilizando las mismas condiciones de

iluminación y exposición para cada objetivo. Las imágenes capturadas fueron almacenadas en formato .TIF de 24bit y procesadas utilizando el software ImageJ (versión 1.46r, NIH). Para el análisis de grosor se midió la longitud transversal de la corteza somatosensorial y motora (imágenes 4x) o de la lámina celular del giro dentado hipocampal (imágenes 40x), n = 8-10 ratones por grupo. La cuantificación de las células NeuN positivas corticales se realizó manualmente en un área de 462 x 348 µm utilizando imágenes (40x) de corteza somatosensorial, motora y prefrontal (capa V, bregma -2,06; 1,18; 1,94 mm respectivamente, [142]. Se utilizaron dos imágenes de cada región por cada ratón analizado (n = 8-10 ratones por grupo).

8. Electroforesis SDS-PAGE e Inmunoblot

Para la obtención de las muestras proteicas, los tejidos cerebrales congelados a -80°C fueron pesados y extraídos en 10 volúmenes (ml/g de tejido) de buffer RIPA (SDS 0,1%; NP-40 1%; deoxicolato de sodio 0,5%; EDTA 5mM; NaCl 150 mM, Tris-HCl 50mM; pH 8,0) conteniendo además un cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasas (Roche). Los tejidos fueron sonicados y centrifugados a 13.000 rpm por 20 min a 4°C. Se recolectó el sobrenadante y se guardó a -80°C hasta su uso. La concentración de proteínas se estimó utilizando el equipo de BCA Protein Assay Kit (Pierce), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, las muestras (dilución 1/10) y el estándar de BSA para la curva (de 0 a 20 µg) se mezclaron con 180 µl del reactivo colorimétrico (50:1 reactivo A:B) del kit. La mezcla se incubó 30 min a 37ºC y luego se midió la absorbancia a 562 nm.

Para el ensayo de SDS-PAGE cantidades iguales de proteínas (30 µg por calle) se diluyeron en buffer de siembra (240 mM Tris-HCl pH 6,8, 8% SDS, 40% Glicerol, 0,04% Azul de Bromofenol, 5% β-mercaptoetanol) en una relación 4:1 y se resolvieron en geles de poliacrilamida con SDS en buffer de corrida pH 8.3 (Tris 25 mM, glicina 0,2 M, SDS 0,1%) en un aparato de electroforesis Mini-PROTEAN Tetra Cell (BioRad) a 80V hasta pasar el gel concentrador y luego a 100 V. En cada gel se utilizó un marcador de peso molecular para utilizar como referencia. Luego de la electroforesis, las proteínas separadas fueron transferidas a membranas de PVDF (Immobilon-P; Millipore) en buffer de transferencia (Tris 25 mM, glicina 0,2 M, SDS 0,025%, metanol 10%) durante 1 h 10 min a 100 V constante. Las membranas fueron bloqueadas con una solución de bloqueo (leche descremada 5% en TBS-Tween 0,1%) durante 2 h a temperatura ambiente, lavadas con TBS-Tween 0,1% e incubadas en presencia del Ac primario durante una noche (16 h), en frío con agitación. Las concentraciones utilizadas fueron 1:20000 anti-TDP-43 policlonal, 1:2000 anti-GAPDH, 1:3000 anti-

Zif268, 1:2000 anti-beta Tubulina. Luego de los lavados con TBS-Tween 0,1% las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente (anti-ratón o anti-conejo conjugado con HRP, concentración 1:5000, Jackson ImmunoResearch) durante 4 h en agitación a temperatura ambiente. La detección se realizó por reacción de quimioluminiscencia utilizando el kit comercial ECL (Pierce). Las imágenes digitales para visualizar las bandas obtenidas fueron adquiridas utilizando el sistema ImageQuant RT ECL Imager (GE Healthcare). La cuantificación de las bandas por densitometría se realizó con el software ImageJ. Los datos obtenidos se expresaron en unidades arbitrarias (UA) y se relativizaron a la señal obtenida en la misma membrana para la intensidad de GAPDH.

9. Análisis Estadístico

Los datos fueron expresados como la media ± SEM. Para el análisis estadístico de los tests conductuales se utilizó el test de Student, cuando se compararon solo dos grupos respecto a un parámetro conductual, y ANOVA de una vía seguido del test post hoc de comparación múltiple Newman-Keuls, cuando se compararon tres o más grupos entre sí. Para los tests visuales (precipicio visual y posicionamiento visual) se utilizó el test no paramétrico de Mann-Whitney. Para la tarea olfativa de habituación/deshabituación, rotarod acelerado y el análisis en segmentos de tiempo en el test de campo abierto se utilizó ANOVA de medidas repetidas seguido del test post hoc de comparación múltiple Bonferroni. Para el análisis de clasping y la tarea de evitación inhibitoria se usó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguido de comparaciones individuales con el test de Mann-Whitney. El análisis estadístico de la cuantificación celular y los inmunoblots se realizó con ANOVA de una vía seguido del test post hoc de comparación múltiple Newman-Keuls. Para los análisis descritos se utilizaron los software Prism 6 (GraphPad) y SPSS (versión 17). Los valores de $p<0,05$ fueron considerados significativos.

RESULTADOS

RESULTADOS

PRIMERA PARTE:
Caracterización Inicial del Modelo: Ratones transgénicos hTDP-43-ΔNLS

En este trabajo se utilizó un novedoso modelo de ratón transgénico con expresión regulable de una versión mutante de la proteína TDP-43 humana (hTDP-43-ΔNLS), generado previamente por Igaz y col [77]. En este modelo de proteinopatías de TDP-43, se utiliza el sistema *tet-off* (respondedor a tetraciclina) y el promotor CaMKIIα (con expresión neuronal mayoritariamente en cerebro anterior), para lograr el control espacio-temporal en la expresión del transgén.

Inicialmente, el trabajo consistió en el aprendizaje del uso y manejo de animales de laboratorio. Las colonias transgénicas fueron expandidas en nuestro bioterio (luego de su traslado hacia Argentina), realizando retrocruzamiento con ratones C57BL/6J para homogeneizar el background genético. Una vez establecidas las colonias, se comenzó con las cruzas de las líneas transgénicas entre sí para la obtención de ratones bigénicos experimentales, en los cuales se verificó la presencia de ambos genes (CaMKIIα/tTa y tetP/hTDP-43-ΔNLS) por medio de la técnica de PCR *(Figura 22)* a partir de biopsias de cola u oreja obtenidas de ratones en p21.

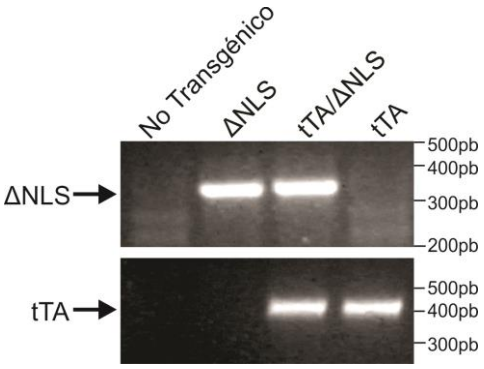

Figura 22: Genotipificación de ratones transgénicos.
Fotografía representativa de una corrida electroforética en gel de agarosa de los productos amplificados por PCR para la detección de los transgenes tetP/hTDP-43-ΔNLS (ΔNLS) y CaMKIIα/tTa (tTA). Los ratones bigénicos experimentales que expresan hTDP-43-ΔNLS son aquellos que presentan ambos productos (tTA/ΔNLS).

La expresión del transgén fue inducida por remoción de Dox de la bebida, al día postnatal 28 (p28) para permitir un mejor desarrollo de los animales. Los animales bigénicos obtenidos fueron analizados a diferentes tiempos luego del destete para los diferentes estudios conductuales o inmunohistológicos *(Figura 23A).* La verificación de

la correcta inducción y expresión del transgén se determinó por inmunofluorescencia utilizando anticuerpos primarios contra la forma humana de TDP-43 (para detectar solo la proteína transgénica) o contra TDP-43 total (reconoce tanto la proteína humana como la endógena del ratón) *(Figura 23B)*. Nótese la expresión citoplasmática de TDP-43 en los ratones tTA/ΔNLS en comparación con los animales control que no expresan el transgén.

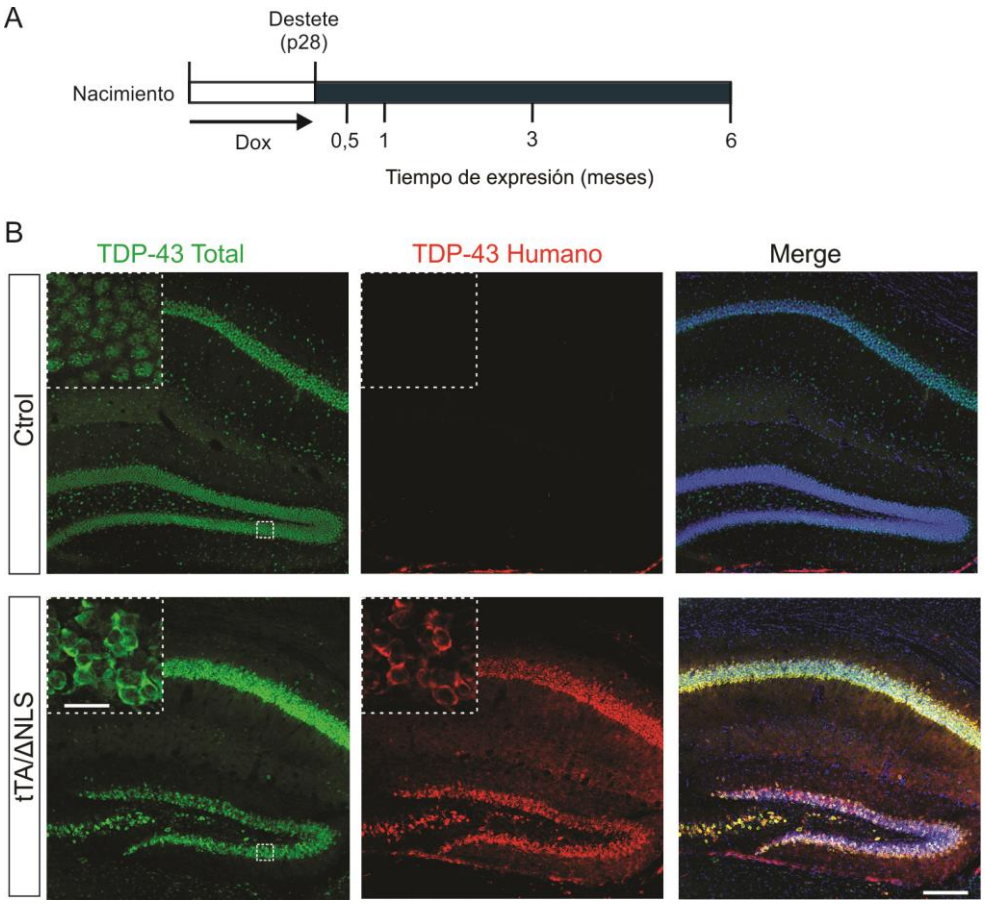

Figura 23: Diseño experimental y análisis de la expresión de hTDP-43-ΔNLS.
A. La expresión del transgén fue activada al destete (p28) por remoción de Dox del agua. Las respuestas conductuales en los ratones bigénicos fueron analizadas a distintos tiempos post-inducción. B. Doble inmunofluorescencia en cortes coronales de hipocampo de ratones de 1 mes de inducción para TDP-43 Total y TDP-43 humano.
Barra de escala 250 µm, recuadro 20 µm.

En una primera etapa, se decidió evaluar el estado general de los ratones bigénicos, para poder evidenciar anormalidades que pudiesen interferir con los tests conductuales a desarrollar. Se realizaron observaciones cualitativas de los animales sin encontrarse problemas visibles en cuanto a su postura, forma de caminar, pelaje, reflejos o comportamiento en la jaula en la que se aloja junto a sus hermanos no

bigénicos (control) de la misma camada. No se encontraron evidencias de atrofia muscular, analizada previamente por tinción con hematoxilina-eosina de músculo estriado en extremidades anteriores y posteriores [77]. Se analizó el crecimiento de los animales por medio de una curva de peso corporal, la cual fue indistinguible respecto a la de los controles, hasta la segunda semana de inducción *(Figura 24A)*. Luego de este punto, los animales bigénicos presentaron una pequeña, pero significativa, disminución del peso corporal (13-18 %), aunque la curva se mantuvo con la misma pendiente en comparación a la de los animales controles (ANOVA de dos vías, $F(1,182) = 20.89$, $p < 0.0001$ para grupo; $F(5,182) = 84.10$, $p < 0.0001$ para tiempo de inducción; $F(5,182) = 3.774$, $p < 0.0028$ para interacción).

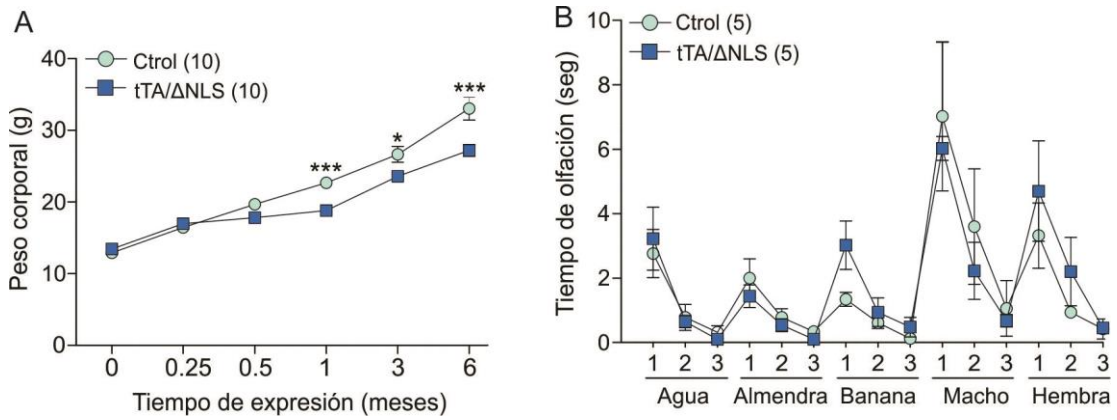

Figura 24: Curva de peso y performance olfativa de los ratones bigénicos.
*A. Curva de peso corporal para los animales control y bigénicos tTA/ΔNLS medida a distintos tiempos de inducción del transgén. *p<0,05;***p<0,001 (ANOVA de dos factores/Bonferroni post hoc). B. Test de olfato habituación/deshabituación. Se utilizaron hisopos para presentar los olores, cada uno fue impregnado con un odorante (agua, extracto de almendra, extracto de banana, raspado de jaula de ratones machos y raspado de jaula de ratones hembras) e inmediatamente presentado al animal por 2 minutos. Se utilizaron ratones de 1 mes de expresión. No se observan diferencias significativas entre los grupos (ANOVA de medidas repetidas/Bonferroni test post hoc). El número de animales utilizados se indica entre paréntesis. Los datos se expresan como media±SEM.*

También se evaluó la percepción visual y la capacidad olfativa de estos ratones, dos sentidos cuya función normal resulta crítica para la obtención de una buena performance en varios de los tests conductuales. Por lo tanto, se quiso verificar que ninguna alteración en los mismos pudiese interferir en las pruebas posteriores. No se encontraron déficits en la percepción visual de los animales experimentales, analizada por medio de dos tareas específicas para tal fin, como el test de precipicio visual, en el cual se enfrenta al animal a un precipicio simulado y se analiza la respuesta de frenado; y el test de posicionamiento visual, que mide la respuesta del animal al acercarse a una superficie visible *(Tabla 4)*. Para el análisis de la

performance olfativa se utilizó una tarea de habituación/deshabituación a diferentes olores novedosos artificiales (almendra, banana) y sociales (raspado de jaula de ratones machos o hembras). Cada olor fue presentado 3 veces para lograr una habituación al mismo, para luego presentar un nuevo olor y de esta manera estimular nuevamente la olfación. Los ratones bigénicos no mostraron diferencias significativas en la performance olfativa, tanto de odorantes artificiales como de olores sociales, respecto a los ratones controles, sugiriendo una función olfatoria intacta (ANOVA de medidas repetidas, $F(1,112) = 0.02245$, $p < 0.8846$ para grupo; $F(14,112) = 14.77$, $p < 0.0001$ para odorante; *Figura 24B*).

Test	Ctrol	tTA/ΔNLS
Respuesta al precipicio visual (%)	83.3	87.5 (7/8) ns.
Respuesta al posicionamiento visual	1.8 ± 0.1	1.2 ± 0.2 ns.

Tabla 4: Test de percepción visual.
Respuesta de frenado al precipicio visual (%) y valoración de la respuesta (media±SEM) en el posicionamiento visual. Los ratones bigénicos de 1 mes de expresión no mostraron alteraciones significativas en la performance visual (ns. no significativo, prueba de U de Mann-Whitney; Ctrol n=12, tTA/ΔNLS=8)

Posteriormente, se analizó la existencia de atrofia cerebral en estos ratones. Para evitar un efecto de dilución por estructuras que no expresan el transgén (como el cerebelo), se estudiaron dos estructuras del cerebro anterior que se encuentran altamente enriquecidas en la expresión del transgén [77]. Se recolectó por disección y posteriormente se pesó tejido cortical e hipocampal de ratones bigénicos y controles, y se observó que los pesos de estas estructuras se vieron significativamente disminuidos a los 6 meses de inducción, pero no así luego de 1 mes de expresión, evidenciando la existencia de una atrofia cerebral progresiva en el tiempo en los ratones bigénicos *(Figura 25).*

Esta caracterización inicial del modelo permitió establecer un punto de partida para la evaluación de nuestro modelo en diferentes paradigmas conductuales asociados a proteinopatías de TDP-43. Los ratones no presentaron alteraciones en el crecimiento, aspecto, ni en las conductas basales en sus jaulas. Además, tanto la visión como la olfación no se vieron afectadas, y no se encontró atrofia grosera (por medición del peso) en estructuras cerebrales enriquecidas en la expresión del transgén, como la corteza e hipocampo, luego de un mes de expresión.

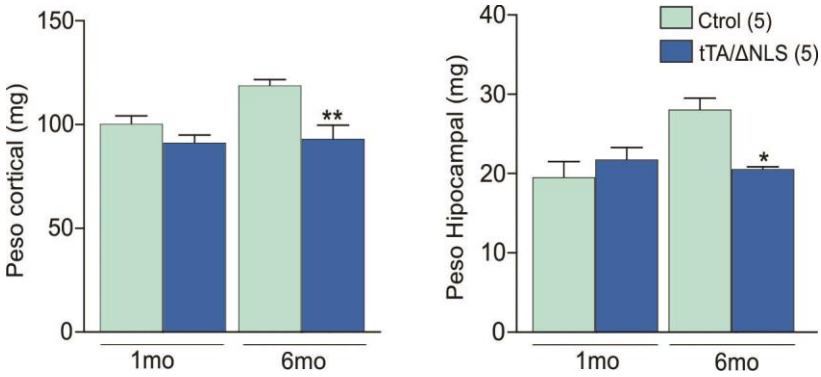

Figura 25: Presencia de atrofia cerebral en ratones transgénicos adultos.
*Pesos de corteza cerebral e hipocampo en ratones control y tTA/ΔNLS de 1 y 6 meses de expresión del transgén (n=5 por grupo). *p<0,05;**p<0,01 diferencias significativas respecto al grupo Ctrol (prueba t de Student). Los datos se expresan como media±SEM.*

Todos los ensayos conductuales realizados en este trabajo fueron realizados a 1 mes de inducción del transgén, a menos que se aclare expresamente otro tiempo.

SEGUNDA PARTE:
La sobreexpresión de hTDP-43-ΔNLS en neuronas del cerebro anterior afecta múltiples dominios conductuales asociados a DFT con enfermedad de motoneurona

1. Los ratones transgénicos hTDP-43-ΔNLS desarrollan alteraciones motoras

La gran mayoría de los modelos transgénicos murinos basados en la sobreexpresión de TDP-43 utilizan promotores ubicuos (promotor PrP) o específicos para neuronas (promotor Thy1), lo que conduce a fenotipos en común, como el comienzo temprano de déficits motores (asociado a degeneración de motoneuronas inferiores) y, eventualmente, a una muerte temprana [143]. Una ventaja de nuestro modelo es que la expresión inducible y enriquecida en cerebro anterior de hTDP-43-ΔNLS ayudaría a eludir estos primeros síntomas que harían imposible estudiar e interpretar otros dominios conductuales, dado que se previene la expresión del transgén en motoneuronas inferiores y la subsecuente degeneración de las mismas. Debido a que es un nuevo modelo transgénico, caracterizado previamente desde el punto de vista neuropatológico y de expresión génica global, en este trabajo inicialmente se evaluó el impacto de la sobreexpresión de hTDP-43-ΔNLS en las funciones motoras.

1.1 Test de Campo Abierto

Para la evaluación general de la locomoción y de la actividad exploratoria se utilizó el test de campo abierto. Los ratones hTDP-43-ΔNLS fueron colocados por primera vez en una caja de Plexiglás transparente (ambiente novedoso) y se los dejó explorarla durante 20 min. La arena fue dividida en dos zonas: periferia y centro.

Los animales transgénicos tTA/ΔNLS mostraron una severa hiperlocomoción en comparación con los animales controles (149,40 ± 21,07m tTA-ΔNLS; 41,34 ± 3,769m Ctrol, *Figura 26A-B*). Al analizar la distancia recorrida en el centro, los ratones transgénicos realizaron un recorrido significativamente menor en esta área respecto a sus contrapartes no transgénicos (*Figura 26A-B*). Dada la tendencia natural de los ratones a recorrer los bordes del campo y evitar las áreas abiertas (más expuestas), esta respuesta indicaría un posible aumento de la respuesta ansiogénica de estos ratones. Para estudiar de una manera más detallada la distancia total recorrida durante el test, se realizó un análisis en segmentos de tiempo de 5 min. En la *Figura 26C* puede observarse que durante los primeros 5 min del test, la locomoción de los animales bigénicos no fue significativamente diferente a la de los animales controles.

Sin embargo, en el transcurso del test, la actividad locomotora se ve incrementada dramáticamente en los animales transgénicos y no logra observarse una habituación al contexto como sí se observa en los animales Ctrol (por lo menos hasta los 20 min analizados).

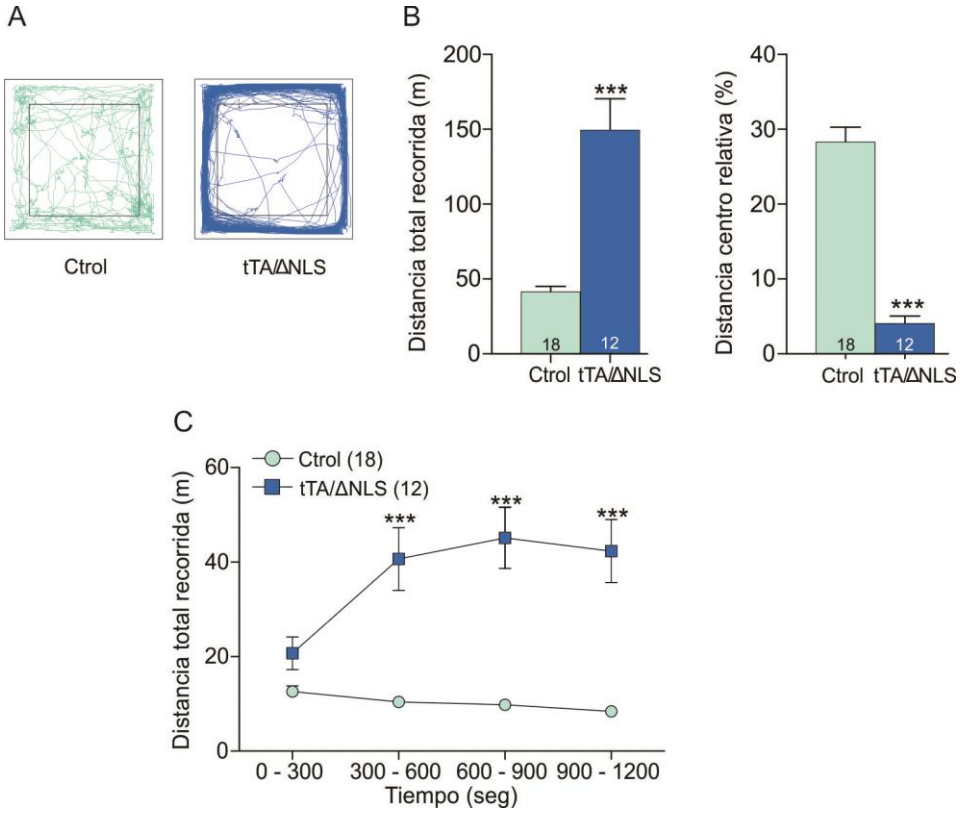

Figura 26: Los ratones tTA/ΔNLS presentan un marcado fenotipo hiperlocomotor.
*La actividad locomotora y exploratoria fue analizada en una sesión de 20 min en el test de campo abierto en animales de 1 mes de expresión. A. Gráficos representativos de actividad locomotora durante la sesión en el ambiente novedoso. B. Distancia total recorrida y distancia centro relativa (***p<0,001, prueba t de Student). C. Distancia total recorrida en segmentos de 300 seg. (***p<0,001, ANOVA de medidas repetidas/Bonferroni test post hoc). El número de animales utilizados se indica en las barras o entre paréntesis. Los datos se expresan como media±SEM.*

El fenotipo hiperlocomotor que presentan los ratones transgénicos podría alterar la interpretación de los resultados obtenidos en otros tests comentados más adelante. Sin embargo, hay que tener en cuenta que, dentro de los primeros 5 min, la conducta de estos animales es muy similar a la de los animales Ctrol (en general los tiempos de la mayoría de los tests son de alrededor de 5 min). Por otro lado, el nivel de hiperlocomoción está sujeto al espacio que tienen los animales para recorrer y a la habituación previa a cada contexto.

1.2 Performance en el Rotarod

Tanto el equilibrio como la coordinación motora de los ratones fueron analizados mediante su performance en el rotarod. Para dicho propósito, animales transgénicos de 1 mes de expresión fueron sometidos a dos configuraciones del test, una versión a velocidad constante y otra versión acelerada. En la versión a velocidad constante (17 rpm), se realizó un único ensayo por animal y los resultados se pueden ver en la *Figura 27A*.

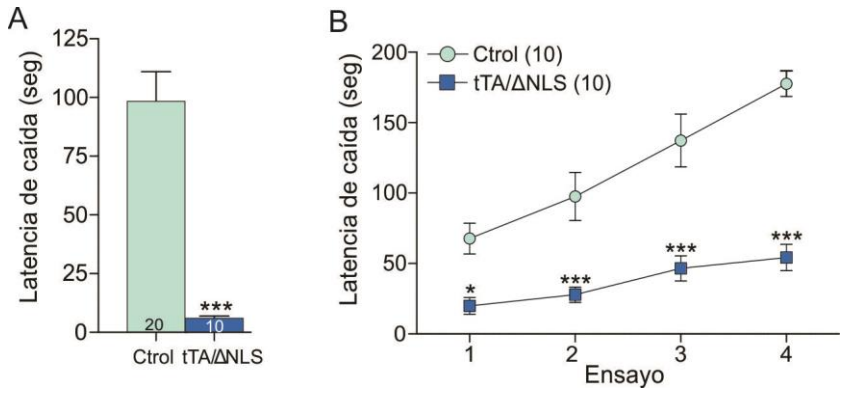

Figura 27: Análisis de balance y coordinación motora en el rotarod.
*A. Rotarod a velocidad constante (17 rpm). Cada ratón fue sometido a 2 ensayos de práctica y luego colocados nuevamente en el cilindro rotatorio para el test. El tiempo de corte de cada sesión fue de 3 min (***p<0,001 diferencias significativas respecto al grupo Ctrol, prueba t de Student). B. Rotarod acelerado (4-40 rpm/5min). Se realizaron 4 ensayos por test con un intervalo de 2 min entre cada uno. Se registró la latencia de caída en cada ensayo (****p<0,001, ANOVA de medidas repetidas/Bonferroni test post hoc). El número de animales utilizados se indica en las barras o entre paréntesis. Los datos se expresan como media±SEM.*

Los animales tTA/ΔNLS mostraron una latencia de caída significativamente menor respecto a los animales Ctrol, evidenciando una baja performance en el equilibrio y coordinación motora. Para obtener una medición más estricta respecto al equilibrio, y que además permita ver una evolución de este parámetro en cada ensayo, también se realizó la versión acelerada del test. En esta configuración los requerimientos para correr hacia adelante aumentan gradualmente, comenzando con 4 rpm hasta 40 rpm. Se realizaron 4 ensayos por animal. Nuevamente, se observa que los animales tTA/ΔNLS presentan una coordinación motora alterada, con latencias de caída significativamente menores para todos los ensayos respecto a los ratones Ctrol (*Figura 27B)*.

1.3 Fenotipo de Clasping

El fenotipo de clasping se utiliza a menudo como un marcador de progresión patológica en varios modelos murinos de neurodegeneración, incluyendo modelos de ataxia cerebral [144]. Refleja un componente de espasticidad en el cual se observa una respuesta anormal de los miembros del animal cuando es suspendido por su cola. Se llevó a cabo un análisis temporal del reflejo de clasping entre 0-6 meses de inducción del transgén. Si bien los animales control mostraron una respuesta normal de escape al ser suspendidos por la cola (extensión de los miembros) para todos los tiempos analizados, luego de un mes de inducción el 100% de los animales bigénicos estudiados presentaron una respuesta alterada de contracción de las patas hacia el tronco *(Figura 28 A-B).* Esta respuesta se mantuvo hasta los 6 meses de expresión.

1.4 Prueba de Fuerza de Agarre (Hang wire test)

Por último, en la batería de tests para evaluar función motora, se realizó el test de agarre. Este permitió determinar si existe alguna disminución en la fuerza de agarre de los ratones transgénicos, reflejada en una disminución en el tiempo que pueden mantener su cuerpo suspendido en una malla de alambre. Como se muestra en la *Figura 28C*, los ratones tTA/ΔNLS presentan una disminución leve pero significativa en la latencia de caída respecto a los ratones Ctrol, mostrando una menor fuerza de agarre.

Los resultados obtenidos de la evaluación motora demuestran que los ratones tTA/ΔNLS desarrollan anormalidades motoras tempranas. Luego de 1 mes de inducción del transgén, los ratones presentan un fenotipo de hiperlocomoción en el test de campo abierto, una coordinación motora alterada medida en el rotarod, un componente de espasticidad en la prueba de clasping y una menor fuerza para mantener su cuerpo suspendido en el test de agarre.

Si bien nuestro modelo presenta déficits motores, no se considera que los mismos resulten un impedimento para poder evaluar otros dominios conductuales. En particular, se podría pensar que el fenotipo hiperlocomotor afecta el análisis cognitivo y social, sin embargo, estos tests tienen tiempos de análisis de pocos minutos, donde la hiperlocomoción de los ratones transgénicos no resulta significativa en el campo abierto (alrededor de 5 min, ver *Figura 26C*). Más aún, en los tests que se desarrollan más adelante, se incluyen mediciones indirectas de locomoción que sirven como un control interno en cada test realizado.

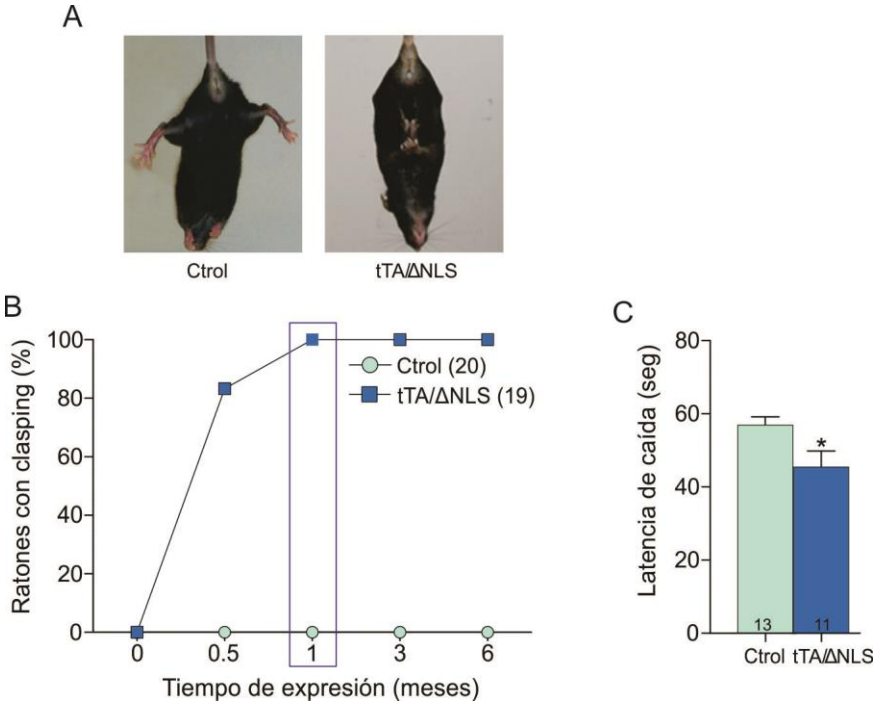

Figura 28: Fenotipo anormal de clasping y disminución de la fuerza de agarre en ratones bigénicos.
*A. Fotografías representativas durante el test de clasping. Los ratones Ctrol muestran una respuesta normal extendiendo los miembros, por el contrario, los animales tTA/ΔNLS contraen anormalmente sus patas hacia el tronco. B. Porcentaje de ratones que presentan fenotipo de clasping a diferentes tiempos de inducción del transgén. C. Test de fuerza de agarre. Se analizó la fuerza de agarre en ratones de 1 mes de inducción para mantener su cuerpo suspendido de una malla de alambre. La latencia de caída fue registrada, se utilizó un tiempo de corte de 60 seg (*p<0,05 diferencias significativas respecto al grupo Ctrol, prueba t de Student). El número de animales utilizados se indica en las barras o entre paréntesis. Los datos se expresan como media±SEM.*

También es importante destacar que no se observó un aumento en la tasa de mortalidad en el modelo, ya que hasta los 6 meses de inducción (último punto temporal de estudio), los ratones tTA-ΔNLS no presentan indicios de una disminución de la sobrevida respecto a los ratones Ctrol.

2. Déficits cognitivos en ratones hTDP-43-ΔNLS

La relocalización citoplasmática de TDP-43 es una característica distintiva de las proteinopatías de TDP-43 [6]. Estudios *in vitro* e *in vivo* en invertebrados y mamíferos mostraron que esta relocalización puede llevar al secuestro de TDP-43 en el citoplasma, toxicidad celular y a alteraciones motoras [16, 145, 146]. Aunque TDP-43 ha sido señalada como un factor relacionado con la actividad neuronal [129], no existe una evidencia clara del efecto de esta localización citoplasmática de TDP-43 en

la memoria y procesos cognitivos. Para determinar si la expresión de TDP-43 restringida al citoplasma en el modelo tTA/ΔNLS conduce a alteraciones cognitivas, se utilizaron los tests de reconocimiento de objeto novedoso, evitación inhibitoria pasiva y alternancia espontánea en el laberinto en forma de Y, en animales de 1 mes de expresión.

2.1 Test de reconocimiento de objeto novedoso

El test de reconocimiento de objetos es un test ampliamente utilizado para el estudio de la memoria en roedores. Es una prueba que depende en gran medida de la función cortical, basándose en la preferencia innata del roedor por un objeto novedoso frente a otro familiar o previamente conocido [147, 148]. Durante el día de entrenamiento, a cada ratón se lo expuso en la misma arena con dos objetos idénticos (en extremos opuestos de la caja) y se estudió algún tipo de preferencia inicial por alguno de los dos objetos, en donde la preferencia se midió como tiempo de exploración. Tanto los ratones control como los bigénicos no presentaron ningún tipo de preferencia por alguno de los objetos idénticos *(Figura 29A)*. El test de retención se realizó a las 24 h postentrenamiento, en donde a cada ratón se le presentó una copia del mismo objeto (objeto familiar) y un objeto novedoso. Mientras que los ratones control mostraron una respuesta esperada de preferencia por el nuevo objeto presentado, los ratones tTA-ΔNLS exploraron de forma similar el objeto familiar y el novedoso, demostrando una alteración en la memoria de reconocimiento *(Figura 29B).*

2.2 Tarea de alternancia en el laberinto en forma de Y

El rendimiento cognitivo también se evaluó mediante el uso del test de alternancia espontánea en el laberinto en forma de Y (*Y-Maze*). Este test permite evaluar la memoria de trabajo y depende principalmente de la corteza prefrontal, así como también del hipocampo, dada su naturaleza de tarea espacial. El laberinto consiste en 3 brazos iguales de Plexiglás transparente colocados con un ángulo de 120° entre cada uno en forma de Y (Brazos A, B y C; *Figura 30A*). La prueba se basa en la preferencia del animal de explorar un nuevo brazo del laberinto en lugar de volver a un brazo visitado previamente [136]. Estas alternancias se cuantificaron de a 3 entradas (“tripletes”). Un triplete o alternancia correcta se definió como un ciclo completo de entradas en cada uno de los 3 brazos sin repetición.

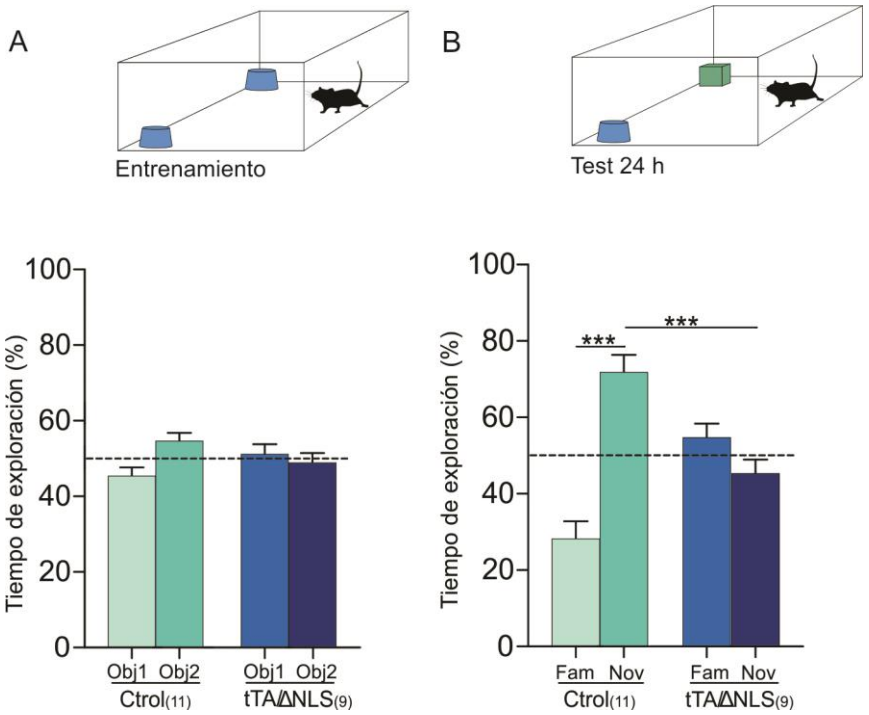

Figura 29: Test de reconocimiento de objeto novedoso.
*A. Día de entrenamiento. Ratones de 1 mes de expresión fueron expuestos a dos objetos idénticos colocados en lados opuestos de la caja experimental por 10 min. No se encontraron diferencias en el tiempo de exploración entre ambos objetos durante la fase de entrenamiento. B. El test de retención se realizó 24 h postentrenamiento. Los animales fueron expuestos por 5 min a un objeto familiar (Fam) presentado previamente y a un objeto novedoso (Nov). El porcentaje de exploración (%) representa el tiempo de exploración el objeto (familiar o novedoso) respecto al tiempo total de exploración (familiar+novedoso). Los animales tTA/ΔNLS no muestran evidencias de memoria de reconocimiento de objetos (***p<0,001, ANOVA de medidas repetidas/Newman–Keuls test post hoc; n = 11 Ctrol, n = 9 tTA-ΔNLS). Los datos se expresan como media±SEM.*

Se calculó el porcentaje de alternancia espontánea correcta y se observó que los ratones control tienden a evitar un brazo previamente visitado, logrando un 70% de alternancias correctas. Los ratones bigénicos, por su parte, alternan al azar, obteniendo un 50% de alternancias espontáneas positivas, difiriendo significativamente de los controles, lo cual estaría indicando un deterioro en la memoria de trabajo *(Figura 30B)*. Para descartar cualquier desviación del resultado por interferencia del fenotipo hiperlocomotor de los ratones transgénicos, se analizaron las entradas totales a los brazos durante el test, como indicador de actividad ambulatoria. El número total de entradas no difirió significativamente entre los grupos *(Figura 30C).*

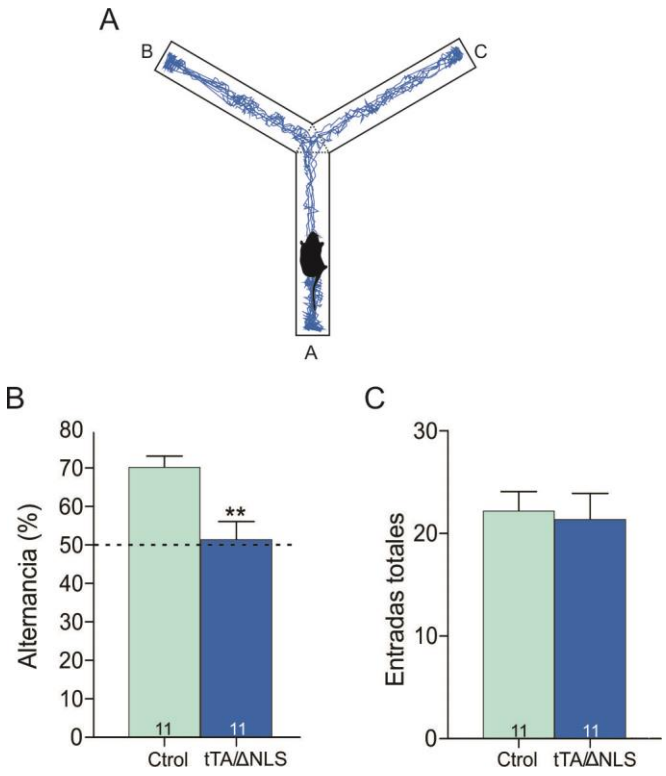

Figura 30: Alternancia en el laberinto en forma de Y.
*A. Diseño esquemático del laberinto en forma de Y. Animales de 1 mes de inducción fueron colocados al final de uno de los brazos mirando hacia el centro y se les permitió explorar el laberinto libremente por 8 min. Se registraron las entradas a cada brazo. En el esquema se muestra un registro de actividad en el laberinto en forma de Y de un animal bigénico. B. Los ratones tTA/ΔNLS alternan al azar entre los brazos (*p<0,05 diferencias significativas respecto al grupo Ctrol, prueba t de Student; n = 11 para ambos grupos). C. Las entradas totales se registraron como una medida de actividad ambulatoria en el laberinto. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos. Los datos se expresan como media±SEM.*

2.3 Test de evitación inhibitoria

Para evaluar el aprendizaje asociativo, se realizó la prueba de evitación inhibitoria, otra tarea cognitiva que tiene la ventaja adicional de ser un paradigma de aprendizaje asociativo motivado por el miedo adquirido en una sola y corta sesión de entrenamiento. Este test se basa en la preferencia innata del roedor por las zonas oscuras y la aversión por las zonas iluminadas. Durante la fase de adquisición/condicionamiento (entrenamiento), cada ratón se colocó en el compartimento iluminado y recibió una descarga plantar inmediatamente después de entrar al compartimento oscuro *(Figura 31A)*.

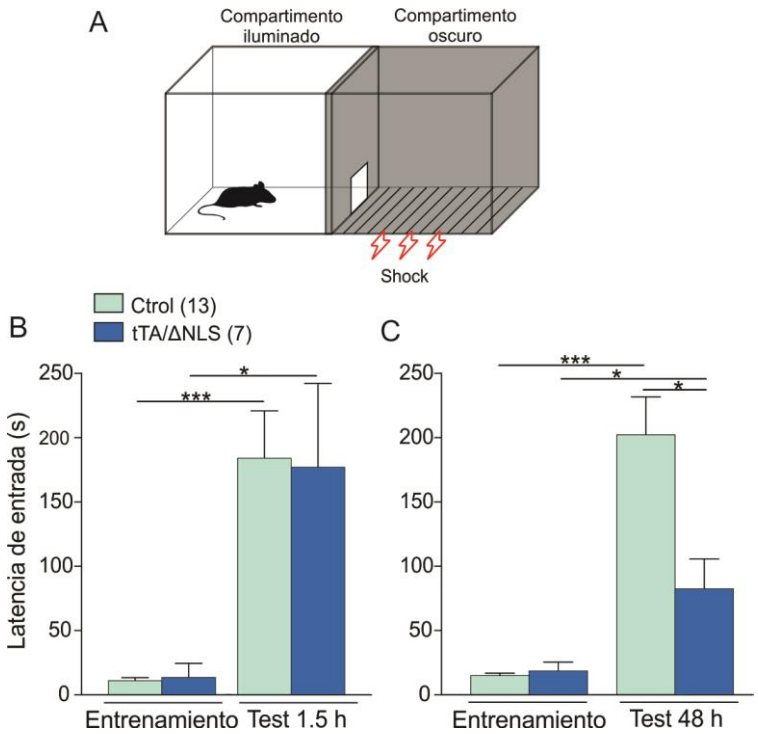

Figura 31: Test de evitación inhibitoria.
*A. Diagrama esquemático del dispositivo utilizado. Durante la fase de entrenamiento, cada ratón recibió un shock eléctrico al entrar al compartimento oscuro. Los tests de retención se realizaron 1,5 h (memoria de corto término) o 48 h (memoria de largo término) postentrenamiento. B. Los ratones bigénicos no presentan alteraciones en la memoria a corto término en comparación con los animales Ctrol. C. 48 h postentrenamiento los ratones hTDP-43-ΔNLS muestran latencias de entrada significativamente menores a los controles, indicando alteraciones en la memoria a largo término (*p<0,05, ***p<0,00, Test de Kruskal–Wallis/prueba U de Mann–Whitney post hoc). El número de animales se indica entre paréntesis. Se utilizaron ratones de 2 meses de expresión. Los datos se expresan como media±SEM.*

La latencia de entrada no mostró diferencias significativas entre los ratones control y los ratones transgénicos con dos meses de inducción *(Figura 31B).* Cuando se analizó la memoria de evitación pasiva a las 48 h (test de retención), los ratones control mostraron latencias de entrada al cuarto oscuro muy elevadas (memoria del evento adverso durante el entrenamiento), mientras que los ratones bigénicos tuvieron latencias de entrada significativamente menores, evidenciando un déficit en la memoria a largo plazo para esta tarea *(Figura 31C).* Es importante destacar que cuando se evaluó la memoria a las 1,5 h después del entrenamiento, no se observaron diferencias significativas entre las latencias de entrada de los ratones control y los ratones tTA/ΔNLS. Esto parecería indicar que los ratones tTA-ΔNLS adquieren la tarea y tienen intacta la memoria a corto plazo, pero no logran consolidarla en una memoria de largo término.

La evaluación cognitiva en el modelo tTA/ΔNLS por medio de tres tareas independientes indican que la sobreexpresión de hTDP-43-ΔNLS, en neuronas del cerebro anterior, estaría afectando las funciones cognitivas en estos ratones.

3. Ratones hTDP-43-ΔNLS presentan conductas sociales alteradas

Si bien los síntomas motores y cognitivos pueden ser parte (en diferentes grados) de las manifestaciones clínicas dentro del espectro de DFT, los pacientes afectados con esta enfermedad también muestran otros tipos de alteraciones conductuales [35]. Una característica prominente en DFT es el comportamiento estereotipado o repetitivo, que resulta útil como criterio diagnóstico y está presente en la mayoría de los pacientes con DFT. En ratones, estas conductas repetitivas se pueden evaluar mediante el auto-acicalamiento (*grooming*) excesivo, una prueba muy utilizada en modelos murinos de autismo. Se estudió en nuestro modelo el nivel de auto-acicalamiento espontáneo y como se muestra en la *Figura 32A* no se observaron diferencias significativas entre los ratones control y bigénicos.

Uno de los síntomas más tempranos y más prominentes en DFT es la disfunción en las conductas sociales, que puede expresarse como una disminución del interés social y pérdida de empatía [149]. Con el objetivo de evaluar este tipo de comportamiento, se realizó el test de interacción social de 3 cámaras en los ratones tTA/ΔNLS. Es una prueba que permite determinar la motivación social del ratón experimental frente al encuentro indirecto con otro ratón no familiar [150]. Se analiza la preferencia del ratón por la interacción (medida como tiempo de olfación) entre un estímulo social (C57BL/6 macho de 21 a 28 días), ubicado en una de las cámaras, y un estímulo no social (objeto similar en tamaño y color a un ratón), ubicado en la cámara opuesta *(Figura 32B)*.

Como se esperaba, los ratones control pasaron mayor cantidad de tiempo interactuando con el otro ratón que con el objeto inanimado. Sin embargo, los ratones bigénicos mostraron una reducción drástica del interés social, ya que la preferencia por el estímulo social fue significativamente menor que en los ratones control *(Figura 32C)*. Una posibilidad es que la disminución en el interés social de los ratones tTA/ΔNLS se deba a alguna conducta de tipo ansiosa por la presencia del estímulo social, que lo perciben como aversivo, o simplemente que prefieran pasar más tiempo en la cámara del estímulo no social. Para descartar estas posibilidades, se analizó el tiempo de exploración de los ratones de la cámara social durante el test y no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos *(Figura 32D)*. Esto estaría

indicando que, a pesar de que los ratones bigénicos pasan un tiempo similar a los ratones control en la cámara social, estos interactúan en menor medida con el estímulo social.

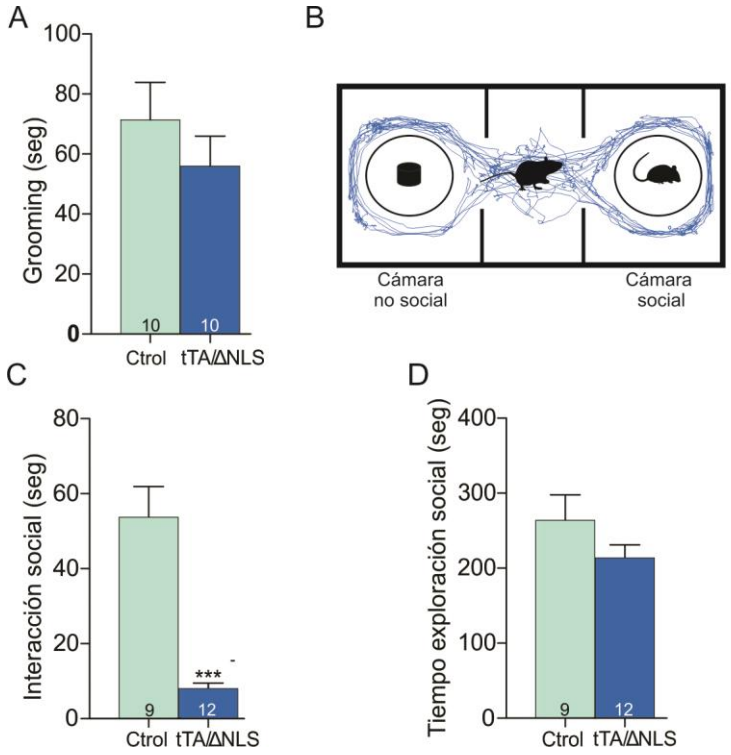

Figura 32: Déficits en conductas sociales en ratones TDP-43-ΔNLS.
*A. Análisis del grooming espontáneo como un tipo de conducta repetitiva. Ratones de 1 mes de expresión fueron colocados en una caja novedosa y se registró el tiempo de auto-acicalamiento por 15 min. No se observaron diferencias significativas entre los grupos. B. Diseño esquemático de la caja experimental utilizada para el test social. Cada ratón experimental de 1 mes de inducción fue expuesto a un estímulo social y un estímulo no social, se registraron durante 10 min los tiempos de interacción (olfación) con cada estímulo. Se muestra un registro de actividad de un animal bigénico. C. Tiempo de interacción social durante la sesión de 10 min. Los animales hTDP-43-ΔNLS presentan un tiempo de interacción significativamente menor a los animales Ctrol (***p<0,001, prueba T de Student). C. No se encontraron diferencias en el tiempo de exploración de la cámara social entre los grupos. El número de animales utilizados se indica en las barras. Los datos se expresan como media±SEM.*

Dado que la evaluación de la interacción social fue medida como tiempo de olfación, el rendimiento de esta prueba depende críticamente de un sentido del olfato intacto. Por otra parte, el promotor utilizado en este modelo también dirige la expresión del transgén al bulbo olfatorio. Como comentamos previamente, los resultados del test de olfación habituación/deshabituación *(Figura 24B)*, indican una función olfatoria intacta en los animales bigénicos.

En su conjunto, estos resultados indicarían un comportamiento social alterado en los ratones tTA-ΔNLS.

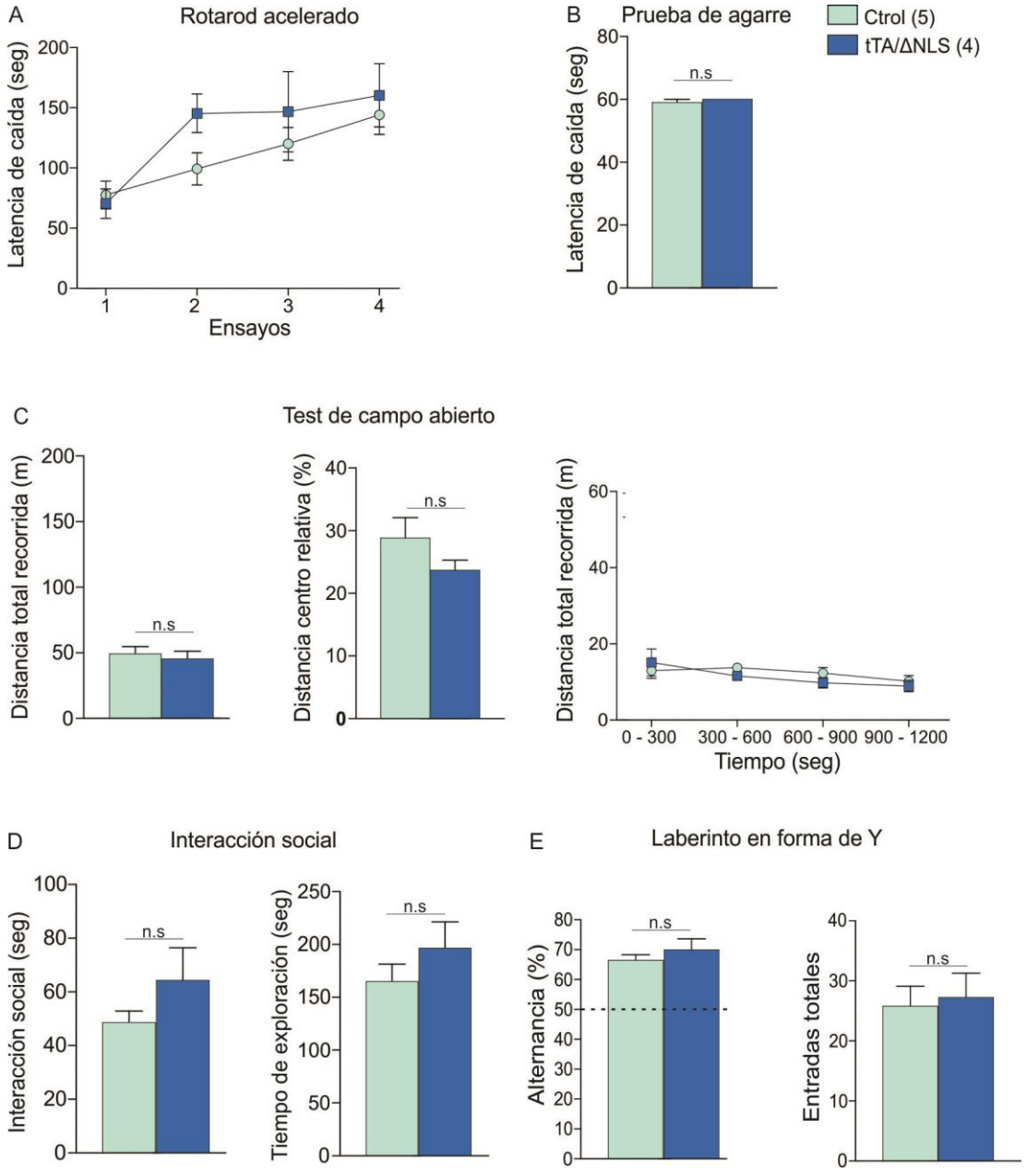

Figura 33: *Análisis de conductas motoras (A-C), sociales (D) y cognitivas (E) en animales control y bigénicos tratados con doxiciclina hasta 1 mes postdestete. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos para ninguno de los tests realizados. Los datos se expresan como media±SEM (n= 5 Ctrol, n= 4 tTA/ΔNLS).*

Los ratones tTA-ΔNLS exhiben conductas alteradas relacionadas con las observadas en las proteinopatías de TDP-43, incluyendo anomalías motoras, reducción de la interacción social y déficits cognitivos, lo cual le da validez como modelo. Sin embargo, un potencial factor que contribuya a estas observaciones podría deberse a un efecto de inserción del transgén en el genoma. Para descartar esta

posibilidad, se evaluaron los distintos paradigmas conductuales estudiados previamente en un grupo de ratones tratados con Dox de forma continua durante todo el experimento (sin inducción del Tg). Es importante destacar que estos animales, con 2 meses de supresión constante de la expresión de hTDP-43-ΔNLS, mostraron respuestas indistinguibles respecto a los ratones control para todos los tests evaluados *(Tabla 5 y Figura 33)*, descartando la posibilidad de algún efecto insercional del transgén.

Test	Ctrol	tTA/ΔNLS
Fenotipo de clasping (%)	0 (0/5)	0 (0/4) ns.
Respuesta al posicionamiento visual	1.8 ± 0.2	2.0 ± 0.0 ns.

Tabla 5: *Análisis del fenotipo de clasping y posicionamiento visual en animales control y bigénicos tratados con doxiciclina hasta 1 mes postdestete. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos para ninguno de los tests realizados. Los datos se expresan como media±SEM (n= 5 Ctrol, n= 4 tTA/ΔNLS).*

TERCERA PARTE:
Estudio de la supresión temporaria del transgén en ratones transgénicos jóvenes y adultos

1. La supresión temporaria del transgén en ratones jóvenes revierte el fenotipo motor y cognitivo alterado

1.1 Diseño experimental de supresión y análisis de la regulación de expresión del transgén

Actualmente, no existen terapias efectivas que modifiquen el curso de las proteinopatías de TDP-43. Incluso, se desconoce si desarrollar una terapia usando como blanco a TDP-43 puede inhibir el proceso neurodegenerativo y revertir las anormalidades conductuales. Habiendo establecido que los ratones tTA/ΔNLS exhiben un fenotipo neurológico, se propuso determinar si el apagado del transgén podría mejorar la sintomatología conductual en nuestro modelo.

Con tal motivo, en primer lugar, se definió un tiempo de interés para el estudio, 1 mes postdestete (como se vino trabajando en los experimentos anteriores). A su vez, a las 2 semanas (0,5 meses) de inducción se decidió tratar nuevamente a los ratones con Dox a fin de suprimir la expresión del transgén por 2 semanas *(Figura 34A)*. La elección de trabajar a 0,5 meses de inducción como un punto de partida para el estudio de la supresión se debe a que ya se ha demostrado que en este tiempo existen cambios globales en la expresión de genes a nivel cortical sin evidencias claras de neurodegeneración generalizada. Más aún, el pico de expresión máxima de hTDP-43-ΔNLS ya se observa a la semana de inducción [77]. En el armado inicial del diseño experimental, tanto los ratones controles como los bigénicos, fueron separados en dos subgrupos (con y sin tratamiento a los 0,5 meses con Dox). Sin embargo, los resultados obtenidos de los animales control tratados y no tratados se unificaron, ya que fueron indistinguibles en todos los parámetros evaluados. Los resultados de los ratones bigénicos, con y sin tratamiento, fueron analizados por separado.

En primer lugar, se estudió la correcta regulación de la expresión del transgén. Para ello, se realizaron inmunofluorescencias dobles usando un anticuerpo policlonal que reconoce tanto la forma humana como la murina de la proteína TDP-43 (TDP-43 total) y un anticuerpo monoclonal que solo reconoce la isoforma humana de TDP-43 (en este caso, hTDP-43-ΔNLS). En la *Figura 34B* se muestran fotos representativas donde puede observarse cómo, en los ratones bigénicos suprimidos de 1 mes post-destete [tTA/ΔNLS(sup)-1m], la marca fluorescente para la variante humana de TDP-43 decae casi completamente en comparación con el grupo no suprimido (tTA/ΔNLS-

1m). En paralelo, se realizaron ensayos de inmunoblot a partir de fracciones (extraídas con buffer RIPA) de la corteza proveniente del otro hemisferio de los mismos ratones experimentales *(Figura 34C)*. Este estudio permitió confirmar que en los ratones (sup)-1m hay una reducción del nivel de expresión del transgén a valores que no difieren significativamente de los del grupo control *(Figura 34D)*.

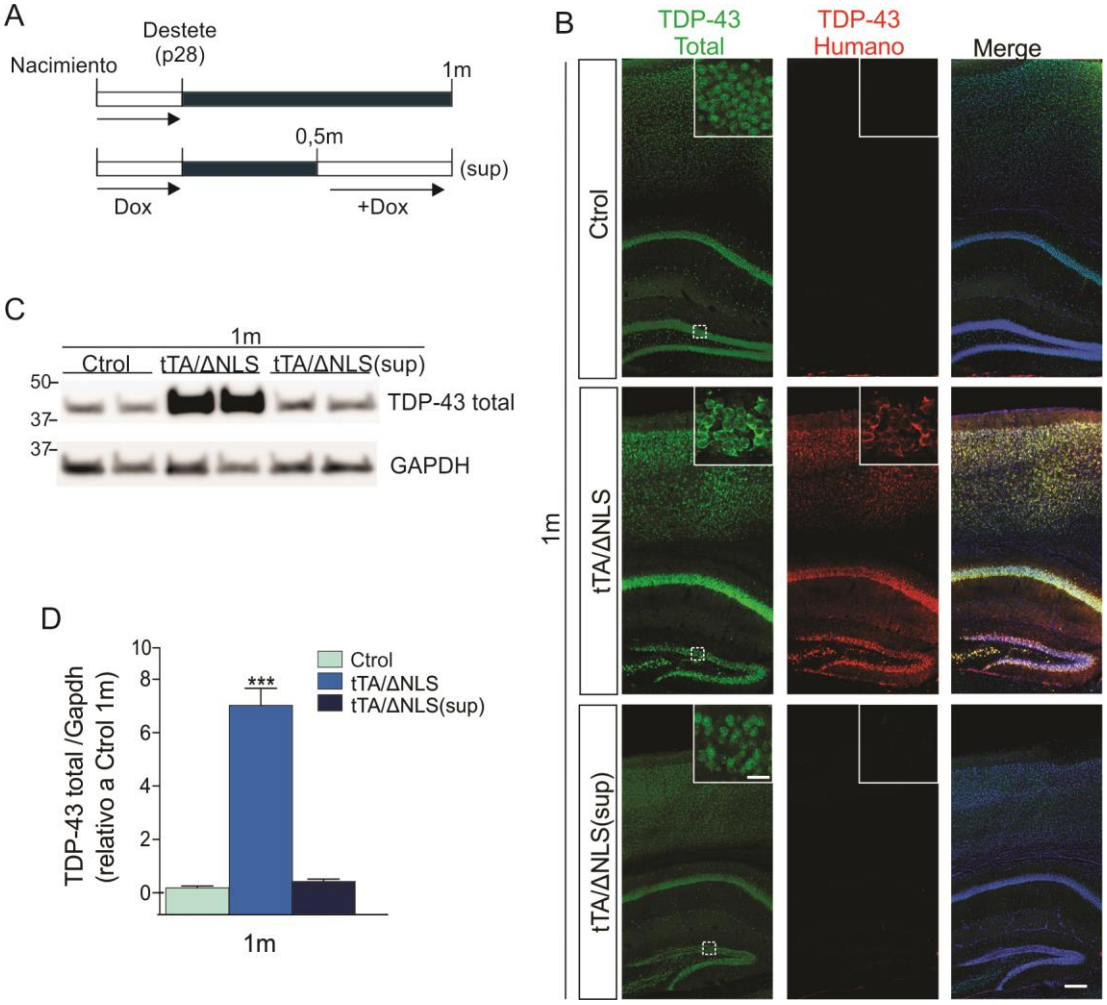

Figura 34: Supresión temporaria de hTDP-43-ΔNLS en ratones jóvenes.
*A. Diseño experimental de supresión. Los animales crecidos con Dox hasta p28 fueron tratados nuevamente con Dox a los 0,5 meses postdestete para suprimir la expresión del transgén durante 2 semanas [tTA/ΔNLS(sup)-1m]. Estos animales fueron comparados con ratones donde se mantuvo la expresión hasta 1 mes postdestete (Ctrol-1m y tTA/ΔNLS-1m). B. Doble inmunofluorescencia en cortes coronales de cerebro de ratones Ctrol-1m, tTA/ΔNLS-1m y tTA/ΔNLS(sup)-1m para TDP-43 Total y TDP-43 humano (Merge incluye también tinción Hoescht en azul). Barra de escala 250 µm, recuadro 20 µm. C. Inmunoblot para TDP-43 Total en extractos corticales en RIPA. GAPDH se utilizó como control de carga. D. Cuantificación del inmunoblot mostrado en C. (***p<0,001, ANOVA de un factor/Newman–Keuls test post hoc, n = 4 para cada grupo). Los datos se expresan como media±SEM.*

1.2 La supresión de hTDP-43-ΔNLS revierte el fenotipo motor alterado

A pesar de que se estableció que los ratones bigénicos presentan un fenotipo motor alterado al mes de inducción *(Figuras 26-28),* en primer lugar, se quiso determinar si estas anormalidades conductuales ya se encontraban presentes al inicio del estudio de la supresión en ratones de 0,5 meses de inducción. De esta forma, este análisis nos permite determinar si la supresión del transgén lleva a una prevención del desarrollo del fenotipo motor, o bien, a una reversión de estas conductas alteradas si ya se encuentran presentes a los 0,5 meses de inducción. El análisis conductual en ratones bigénicos de 0,5 meses de inducción reveló alteraciones significativas tanto para la versión a velocidad constante como para la acelerada del rotarod *(Figura 35A-B, izquierda)*, demostrando que este es un fenotipo ya instalado muy tempranamente luego de la inducción. Y que, por lo tanto, puede evaluarse si existe una reversión del fenotipo luego de la supresión del transgén.

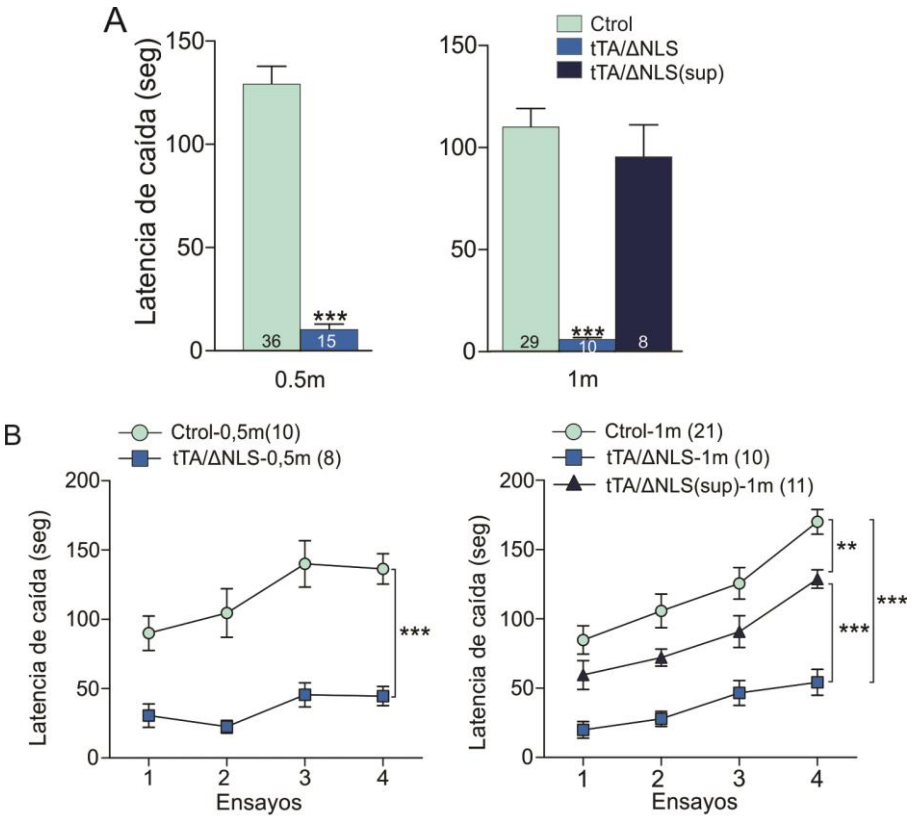

Figura 35: La supresión de hTDP-43-ΔNLS revierte la performance en el rotarod.
*Análisis del balance y la coordinación motora en animales de 0,5m, 1m y (sup)- 1m. A. Rotarod a velocidad constante. B. Rotarod acelerado. Ratones de 0,5m presentan alteraciones en el rotarod en comparación con animales Ctrol. Animales tTA/ΔNLS(sup) revierten las alteraciones motoras (A izquierda ***p<0,001, prueba t de Student; A derecha ***p<0,001, ANOVA de un factor/Newman–Keuls test post hoc; B **p=0,007, ***p<0,001, ANOVA de medidas repetidas/Bonferroni test post hoc). El número de animales utilizados se indica en las barras o entre paréntesis. Los datos se expresan como media±SEM.*

Cuando se estudió la performance de los ratones (sup)-1m en esta prueba, se obtuvo un resultado muy interesante, debido a que estos animales mostraron una normalización completa de su performance, no evidenciando diferencias significativas respecto al grupo control en la versión a velocidad constante *(Figura 35A, derecha)*. En la versión acelerada del rotarod los animales suprimidos mostraron una reversión significativa de su fenotipo con respecto a los ratones tTA/ΔNLS-1m, sin embargo, no alcanzaron el nivel de performance de los animales control *(Figura 35B, derecha)*.

Se realizó un análisis similar, utilizando el test de campo abierto. En primera medida, se demostró que el fenotipo hiperlocomotor y de disminución de la distancia centro ya está instaurado a 0,5 meses de inducción, como puede evidenciarse en la *Figura 36A-B, izquierda.*

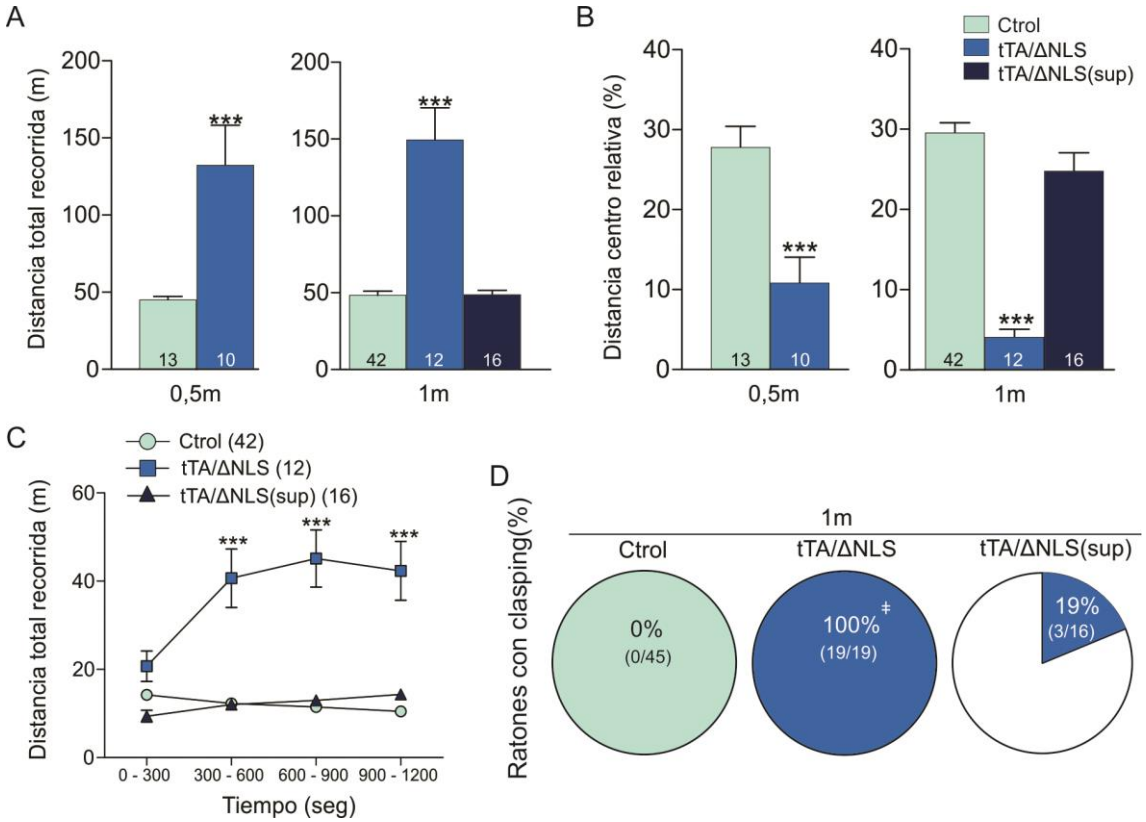

Figura 36: Ratones jóvenes suprimidos revierten el fenotipo hiperlocomotor.
*A. Distancia total recorrida en el ambiente novedoso. B. Distancia centro relativa durante la sesión del test de campo abierto. C. Análisis de la distancia total recorrida en segmentos de 5 min. D. Análisis del fenotipo de espasticidad motora (clasping). Ratones de 0,5m presentaron un fenotipo hiperlocomotor. Animales tTA/ΔNLS(sup) revierten las alteraciones motoras (A-B izquierda ***p<0,001 diferencias significativas respecto al grupo Ctrol, prueba t de Student; A-B derecha ***p<0,001, ANOVA de un factor/Newman–Keuls test post hoc; C ***p<0,001, diferencias significativas respecto a los grupos Ctrol y tTA/ΔNLS(sup), ANOVA de medidas repetidas/Bonferroni test post hoc; D ‡p<0,001 diferencias significativas respecto a los grupos Ctrol y tTA/ΔNLS(sup), Test de Kruskal–Wallis/prueba U de Mann–Whitney post hoc). El número de animales utilizados se indica en las barras o entre paréntesis. Los datos se expresan como media±SEM.*

Luego se realizó el test con los animales suprimidos y los resultados muestran que estos ratones revierten completamente el fenotipo locomotor alterado, tanto para el parámetro de hiperlocomoción (incluyendo el análisis de la distancia total recorrida en segmentos de 5 min) como para la distancia recorrida en el centro del campo, mostrando una conducta indistinguible respecto al grupo control *(Figura 36A-B, derecha; C).* Por último, se evaluó el reflejo de clasping y al igual que en los otros tests motores, también pudo observarse una recuperación significativa en la performance de los ratones suprimidos con solo un 19% de animales que conservan este reflejo anormal (*Figura 36D).*

En conjunto estos resultados demuestran que la supresión en la expresión de hTDP-43-ΔNLS en ratones jóvenes por tratamiento con Dox luego de establecido el perfil patológico logró revertir las alteraciones motoras, llevando a una recuperación funcional en este dominio conductual.

1.3 La supresión de la expresión del transgén en ratones jóvenes mejora las conductas cognitivas alteradas pero no así las conductas sociales

Dado que distintos dominios conductuales pueden estar siendo afectados de forma diferente cuando se reprime la expresión del transgén, también se propuso analizar si el tratamiento con Dox puede revertir otras conductas alteradas además de la performance motora. Por este motivo, se evaluó si las alteraciones cognitivas y sociales ya se encontraban presentes al comienzo del estudio de supresión (0,5 meses), utilizando el laberinto en forma de Y y el test de preferencia social, respectivamente. En las *Figuras 37-38, izquierda,* puede observarse cómo los ratones bigénicos con 0,5 meses de inducción ya poseen un fenotipo de alternancia al azar en el laberinto en Y y una preferencia por el estímulo social significativamente menor respecto al grupo control (no tan marcada como en ratones con un mes de inducción, *Figura 32*). De esta forma, determinamos que los tres dominios conductuales analizados (motor, cognitivo y social) se establecen muy rápidamente luego de la expresión de hTDP-43-ΔNLS.

Posteriormente, se analizaron las conductas utilizando el mismo protocolo de supresión empleado en las conductas motoras, administrando nuevamente Dox a los 0,5 meses de inducción. El tratamiento con Dox durante dos semanas fue capaz de rescatar la memoria espacial de trabajo dado que los ratones tTA/ΔNLS(sup)-1m presentan un porcentaje de alternancias correctas que no difiere significativamente de los animales controles *(Figura 37A, derecha)*. En la *Figura 37B, derecha,* se observa que los controles de locomoción para todos los grupos estudiados no difieren significativamente entre sí.

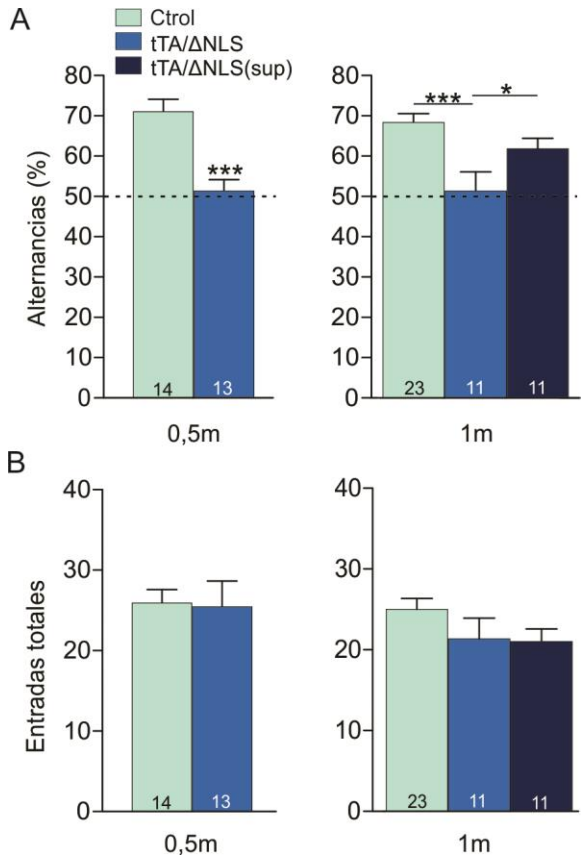

Figura 37: Reversión de conductas cognitivas en ratones tTA/ΔNLS(sup)-1m.
*Evaluación de la memoria de trabajo en animales de 0,5m, 1m [Ctrol , tTA/ΔNLS y tTA/ΔNLS(sup)]. A. Porcentaje de alternancias espontáneas durante la sesión de 8 min en el laberinto en forma de Y. B. Entradas totales como indicador de locomoción. Se detectaron alteraciones cognitivas en animales de 0,5m. La supresión de hTDP-43-ΔNLS rescata las alteraciones cognitivas (A izquierda ***p<0,001, prueba t de Student; A derecha *p<0,05; ***p<0,001, ANOVA de un factor/Newman–Keuls test post hoc). El número de animales utilizados se indica en las barras. Los datos se expresan como media±SEM.*

Respecto a las conductas sociales, la supresión del transgén no logró mejorar el nivel de interacción social. Los valores de exploración social en los animales tTA/ΔNLS(sup) fueron similares a los obtenidos en ratones bigénicos de 1 mes de inducción (tTA/ΔNLS), mostrando en ambos casos diferencias significativas respecto al grupo control.

Estos resultados estarían indicando que el fenotipo conductual alterado en estos ratones transgénicos se desarrolla rápidamente luego de la inducción del transgén, los cuales ya son evidentes a los 0,5 meses de inducción. Sin embargo, los circuitos neuronales que soportan los diversos dominios conductuales estudiados se verían afectados diferencialmente por la sobreexpresión de hTDP-43-ΔNLS, siendo algunos déficits conductuales posibles de ser revertidos luego de la supresión y otros no.

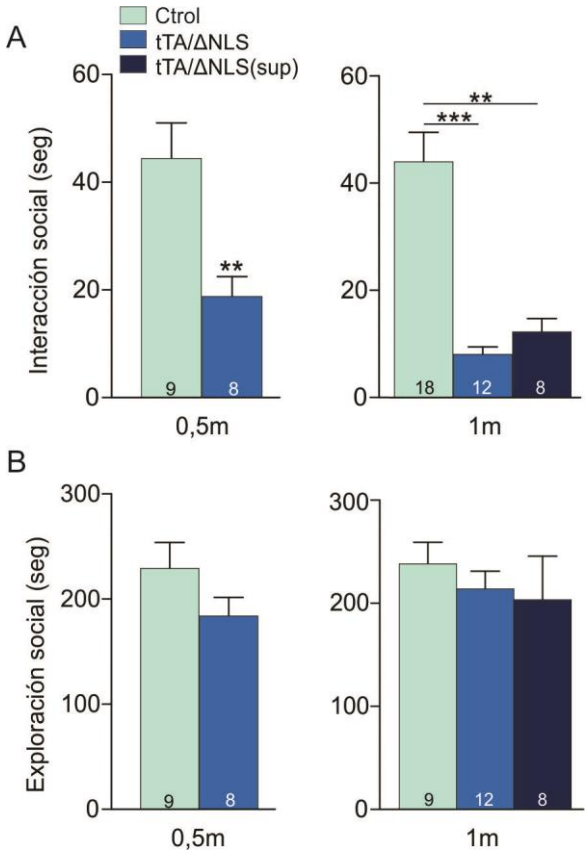

Figura 38: La supresión de hTDP-43-ΔNLS no rescata los déficits sociales.
*Análisis de la interacción social en animales de 0,5m, 1m [Ctrol, tTA/ΔNLS y tTA/ΔNLS(sup)]. A. Tiempo de olfación del estímulo social durante la sesión de 10 min en el test de interacción social. B. Tiempo de exploración de la cámara social. Animales de 0,5m presentan déficits en la interacción social. La supresión del transgén en ratones jóvenes no logra rescatar el fenotipo social alterado. (A izquierda **p<0,01, prueba t de Student; A derecha **p<0,01; ***p<0,001, ANOVA de un factor/Newman–Keuls test post hoc). El número de animales utilizados se indica en las barras. Los datos se expresan como media±SEM.*

2. Los ratones hTDP-43-ΔNLS jóvenes presentan una limitada neurodegeneración

Una pregunta que surge a partir de los experimentos de supresión en los ratones bigénicos es si: 1) estos déficits conductuales presentan una correlación con fenómenos de neurodegeneración en regiones cerebrales relevantes para las tareas estudiadas, o 2) si las alteraciones son causadas por cambios en las funciones neuronales de células que expresan hTDP-43-ΔNLS sin una importante pérdida neuronal en los circuitos implicados. Para abordar esta interrogante, se evaluaron por inmunofluorescencia fenómenos de atrofia cerebral y pérdida neuronal en distintas regiones de interés. Se utilizaron cortes inmuno-marcados con el anticuerpo anti-NeuN, el cual nos permitió visualizar neuronas maduras. El peso total del tejido a 1

mes postinducción no sugirió una gran pérdida neuronal en corteza e hipocampo *(Figura 25)*, sin embargo, la medición del peso total de una estructura no permite discriminar fenómenos de neurodegeneración locales en regiones o subregiones específicas. Por este motivo, se llevaron a cabo mediciones del ancho de la corteza somatosensorial (CSS), de la corteza motora (CM) y de la capa de células granulares del giro dentado en el hipocampo (GD). Las microfotografías de los cortes marcadas con NeuN permitieron confirmar y expandir nuestra observación previa de que las células granulares del GD son muy susceptibles a la degeneración asociada a la sobreexpresión de hTDP-43-ΔNLS [77] *(Figura 39A)*. Los animales bigénicos de 1 mes de inducción presentan un ancho significativamente menor respecto a los animales control (una disminución del 38% del ancho de la capa de células granulares). Lo que resulta interesante, es que los ratones tTA/ΔNLS(sup) presentan un aumento significativo en el ancho del GD respecto al grupo tTA/ΔNLS, pero también una disminución significativa en comparación al grupo control, sugiriendo un rápido proceso de pérdida de neuronas granulares luego de la inducción del transgén y un efecto preventivo del apagado del mismo, lo que provoca un fenotipo intermedio para el grupo suprimido.

De manera similar, se analizó el ancho de CSS y CM en las imágenes inmuno-marcadas con NeuN, midiendo la longitud transversal de las cortezas. Tanto para los ratones tTA/ΔNLS como para los tTA/ΔNLS(sup) no se detectaron cambios significativos en el ancho, en comparación con el grupo control *(Figura 39B-C).*

Si bien no se detectaron cambios en el ancho de las cortezas, se quiso estudiar con mayor profundidad posibles signos de neurodegeneración incipiente en las regiones corticales de interés. Se examinaron con mayor detalle las diferentes regiones corticales mediante la cuantificación de células NeuN positivas en imágenes 40x de CSS, CM y corteza prefrontal medial (CPFm), todas ellas regiones donde se expresa abundantemente el transgén. Dado que en estudios de casos de DFT y en modelos murinos de TDP-43 (incluyendo el modelo estudiado en este trabajo) se observa un aumento de agregados ubiquitinados, gliosis reactiva y neurodegeneración en la capa V de la corteza cerebral [74, 77, 151], se enfocó el análisis en dicha capa.

En primer lugar, se analizaron cortes de cerebro de ratones de 0,5 meses de inducción. No se detectaron cambios significativos del número de neuronas NeuN+ respecto al grupo control para las cortezas CSS y CM *(Figura 40A-C).*

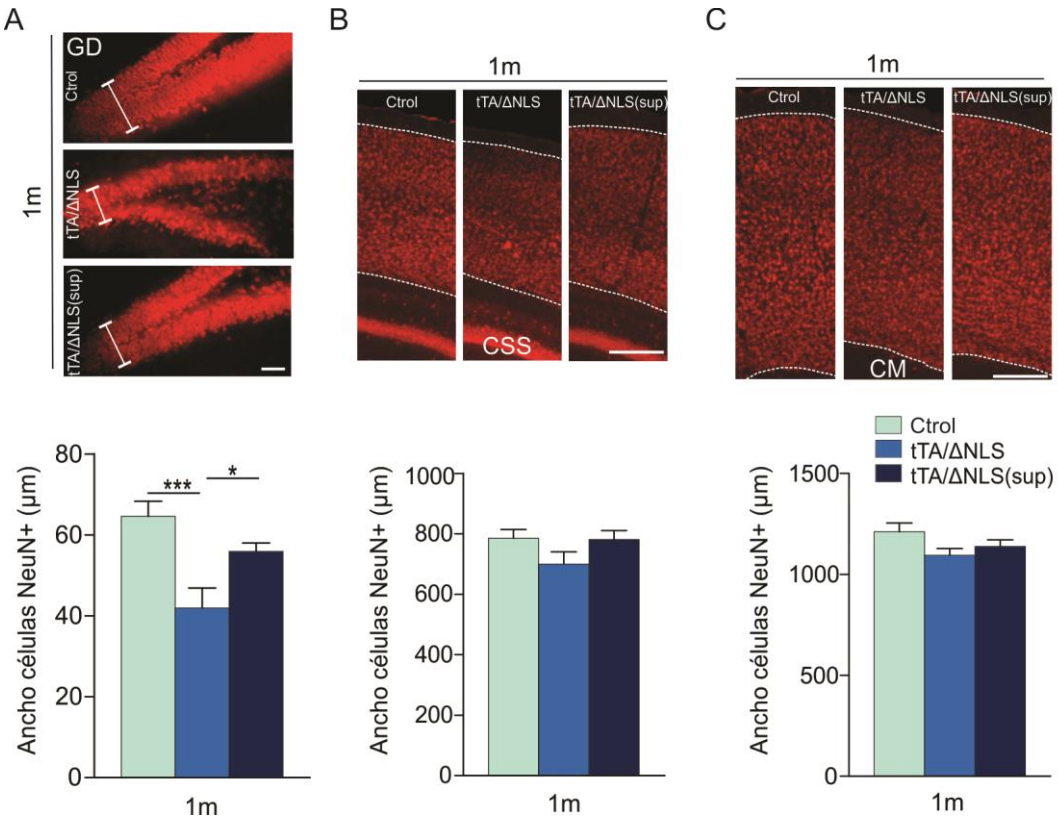

Figura 39: Análisis de atrofia cerebral en animales bigénicos.
*A-C. Inmunofluorescencia para el marcador neuronal NeuN en cortes coronales de cerebro de ratones Ctrol-1m, tTA/ΔNLS-1m y tTA/ΔNLS(sup)-1m (panel superior) y medición del ancho de la capa de células granulares del GD (A), CSS (B) y CM (C) (panel inferior). El ancho del GD resultó significativamente menor en comparación con el grupo Ctrol y suprimido (*p<0,05; ***p<0,001, ANOVA de un factor/Newman–Keuls test post hoc, n = 8-10 por grupo). Barra de escala: A. 50 µm, B y C 250 µm. Los datos se expresan como media±SEM.*

Al analizar el conteo celular en muestras de ratones de 1 mes de inducción, se observó una ligera, pero significativa, disminución de neuronas en la CSS. Una disminución similar se obtuvo al analizar los animales bigénicos de 1 mes suprimidos *(Figura 40A-B).* Cuando se analizó la CM y CPFm, el conteo celular mostró una disminución significativa de neuronas en los ratones tTA/ΔNLS al mes de inducción respecto al grupo control. Sin embargo, en estas mismas estructuras, para los animales tTA/ΔNLS(sup) no se observaron signos de pérdida neuronal *(Figura 40C-D).* Podría inferirse que esta respuesta variable de la pérdida neuronal en los ratones suprimidos indica que diferentes regiones corticales poseen distinta susceptibilidad a los cambios provocados por el transgén.

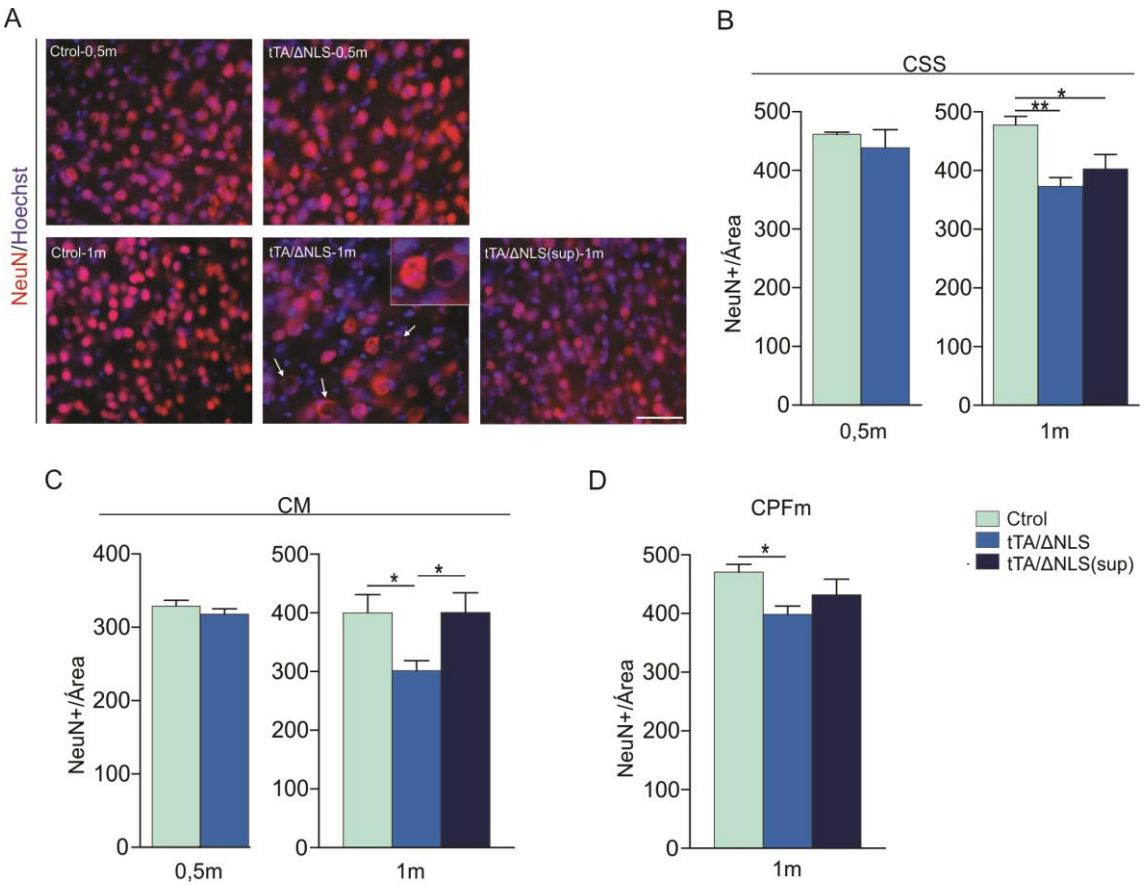

Figura 40: Ratones tTA/ΔNLS-1m presentan una moderada pérdida neuronal.
*A. Inmunofluorescencia para NeuN en animales de 0,5m y 1m. Fotografías representativas de la CSS. Los ratones tTA/ΔNLS-1m presentan neuronas con relocalización de la marca de NeuN (flechas blancas). Recuadro: detalle de la localización alterada de NeuN. Barra de escala: 50 µm. B-C. Cuantificación de células NeuN+ en regiones corticales (capa 5) para la CSS (B), CM (C) y CPFm (D). Los animales bigénicos muestran una pérdida neuronal significativa en las regiones analizadas (*p<0,05; **p<0,01, ANOVA de un factor/Newman–Keuls test post hoc, n = 8-10 por grupo). Los datos se expresan como media±SEM.*

Otro aspecto a tener en cuenta es la relocalización de la marca NeuN del núcleo hacia el citoplasma, que algunos autores refieren que podría usarse como indicador de daño neuronal [152, 153]. Se analizó la presencia de relocalización de la marca en las muestras utilizadas para el recuento celular. Si bien los ratones control no presentaron neuronas corticales con una localización alterada de NeuN, en los animales bigénicos de 1 mes de inducción se observaron neuronas dañadas en la CSS *(Figura 40A)*. Este efecto en la relocalización de la marca de NeuN no se observó cuando el transgén fue suprimido. Una tendencia similar se observó para la CM y CPFm.

Estos resultados sugieren que el tratamiento de supresión con Dox a los 0,5 meses de inducción frena el proceso de neurodegeneración, aumentando la proporción de neuronas que sobreviven, disminuyendo el número de neuronas

dañadas y, por lo tanto, incrementando el número de unidades funcionales activas en los circuitos neuronales relacionados con las conductas afectadas en el modelo.

3. Persistencia de déficits motores en ratones adultos de 6 meses de inducción luego de la supresión del transgén

3.1 Diseño experimental de supresión y análisis de la regulación de expresión del transgén en ratones adultos

En muchos modelos de enfermedades neurodegenerativas se asume que una vez establecidas las alteraciones conductuales, la concurrente y progresiva neurodegeneración que tiene lugar es responsable del fenotipo asociado. Dado que el modelo estudiado en este trabajo tiene una rápida progresión en cuanto a déficits conductuales, con una pérdida neuronal relativamente leve, se propuso estudiar el potencial de reversión en ratones adultos con mayor tiempo de expresión del transgén. En particular, se hizo foco en un dominio (el motor) que se encontraba alterado a tiempos cortos luego de la inducción del transgén y que fue revertido completamente con la supresión del mismo en ratones jóvenes.

Se estableció un protocolo de supresión de corto término en ratones adultos con 5,5 meses de inducción del transgén. El protocolo utilizado fue similar al desarrollado con ratones jóvenes. La supresión se llevó a cabo por tratamiento con Dox durante 2 semanas y los estudios se realizaron a los 6 meses, definiendo un grupo de ratones bigénicos de 6 meses de inducción tTA/ΔNLS-6m, un grupo de animales bigénicos de 5,5 meses de inducción y 2 semanas de supresión, tTA/ΔNLS(sup)-6m y el grupo control (Ctrol, ratones que no expresan el transgén) *(Figura 41A)*. Se analizó la regulación de la expresión del transgén durante la supresión en ratones adultos, por medio de doble inmunofluorescencia, con anticuerpo policlonal anti-TDP-43 total (humano + murino) y anticuerpo monoclonal anti hTDP-43. Como se mostró anteriormente para ratones jóvenes tTA/ΔNLS(sup)-1mo *(Figura 34),* en ratones de 5,5 meses de inducción la supresión del transgén resultó efectiva, ya que la marca para hTDP-43-ΔNLS decae casi completamente en comparación con el grupo tTA/ΔNLS-6mo *(Figura 41B)* y la señal para TDP-43 total se asemeja en intensidad a la del grupo control. Como puede observarse en la *Figura 41C* también se comprobó por medio de Western Blot la correcta regulación a partir de fracciones corticales extraídas con buffer RIPA obtenidas de los mismos animales. La supresión del transgén restauró los valores basales de TDP-43 en el grupo tTA/ΔNLS(sup)-6m *(Figura 41D).*

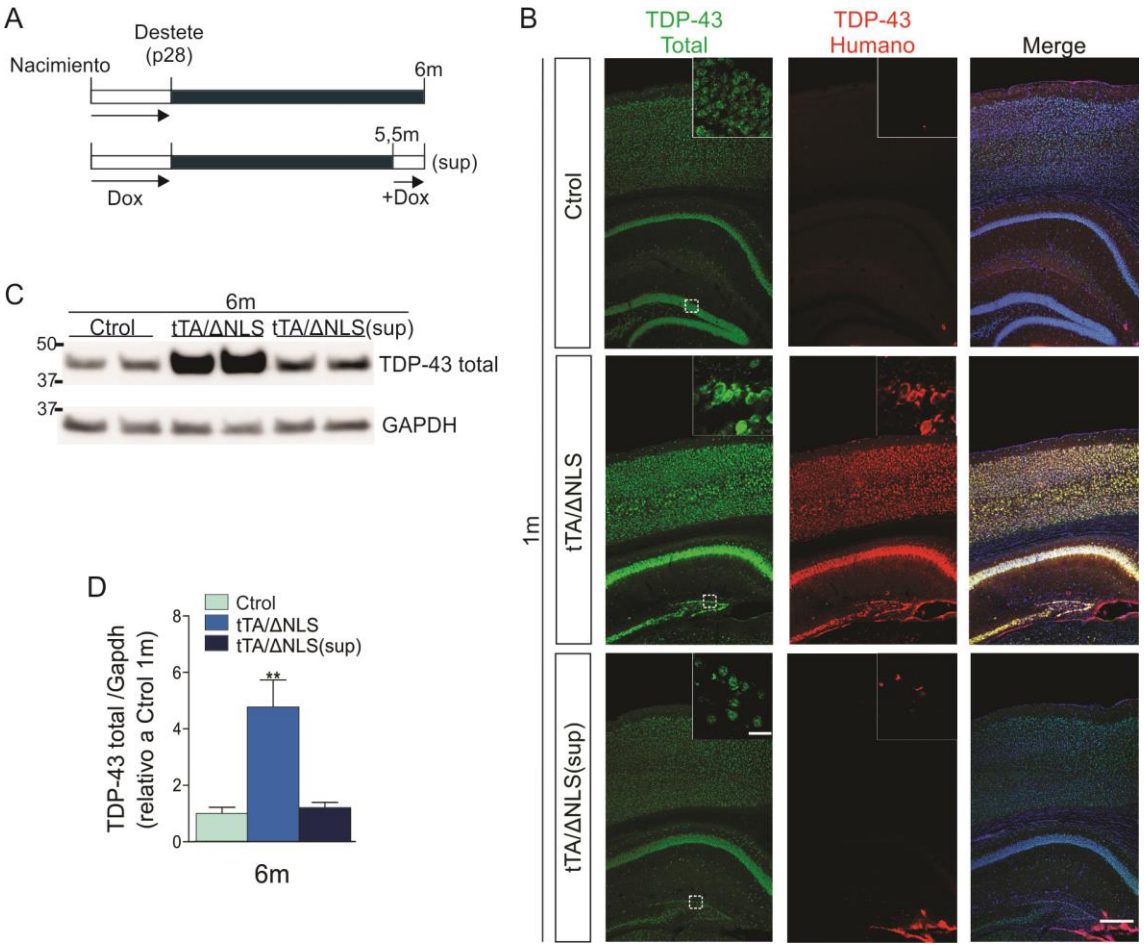

Figura 41: Supresión temporaria de hTDP-43-ΔNLS en ratones adultos.
*A. Diseño experimental de supresión. Los animales crecidos con Dox hasta p28 fueron tratados nuevamente con Dox a los 5,5 meses postdestete para suprimir la expresión del transgén durante 2 semanas [tTA/ΔNLS(sup)-6m]. Estos animales fueron comparados con ratones donde se mantuvo la expresión hasta 6 meses postdestete (Ctrol-6m y tTA/ΔNLS-6m). B. Doble inmunofluorescencia en cortes coronales de cerebro de ratones Ctrol-6m, tTA/ΔNLS-6m y tTA/ΔNLS(sup)-6m para TDP-43 Total y TDP-43 humano. Barra de escala 250 µm, recuadro 20 µm. C. Inmunoblot para TDP-43 Total en extractos corticales en RIPA. GAPDH se utilizó como control de carga. D. Cuantificación del inmunoblot mostrado en C. (**p<0,01, ANOVA de un factor/Newman–Keuls test post hoc, n = 3 para cada grupo). Los datos se expresan como media±SEM.*

3.2 La supresión de hTDP-43-ΔNLS en ratones adultos no revierte el fenotipo motor alterado

Dado que la performance motora fue un parámetro que se recuperó completamente luego del protocolo de supresión de hTDP-43-ΔNLS en ratones jóvenes, se decidió evaluar a los animales tTA/ΔNLS-6m en este mismo dominio y estudiar qué sucedía al apagar la expresión del transgén en los ratones tTA/ΔNLS(sup)-6m.

Se evaluaron los animales en el rotarod acelerado y, como se esperaba, los ratones bigénicos de 6 meses de inducción tuvieron una baja performance en esta tarea. Sin embargo, al contrario de lo que se observó en el experimento de supresión con ratones jóvenes, el tratamiento con doxiciclina por dos semanas falló en rescatar el fenotipo en ratones adultos. No se encontraron diferencias significativas en las latencias de caída del rotarod entre los animales tTA/ΔNLS-6mo y tTA/ΔNLS(sup)-6m *(Figura 42A).*

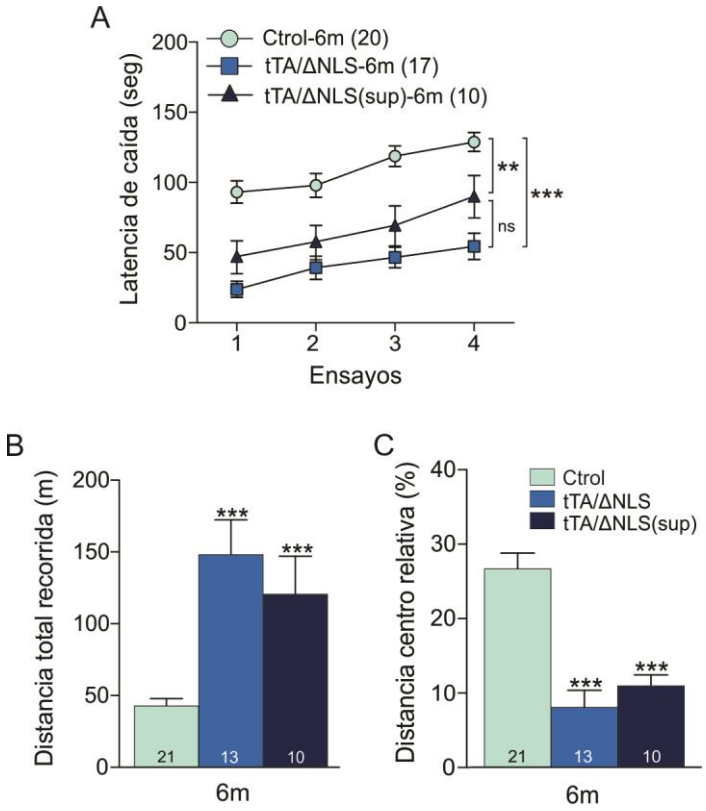

Figura 42: Ratones adultos suprimidos no revierten el fenotipo motor.
*Análisis de conductas motoras en animales de 6m y 6m(sup). A. Rotarod acelerado. B. Distancia total recorrida en el test de campo abierto. C. Distancia centro relativa. Animales tTA/ΔNLS(sup)-6m no revierten las alteraciones motoras (A, **p<0,01, ***p<0,001, ANOVA de medidas repetidas/Bonferroni test post hoc; B-C, ***p<0,001, ANOVA de un factor/Newman–Keuls test post hoc). El número de animales utilizados se indica en las barras o entre paréntesis. Los datos se expresan como media±SEM.*

De forma similar, se analizó la presencia de clasping. Los ratones tTA/ΔNLS-6m presentan una penetrancia del 100% del fenotipo de clasping. Por su parte, el apagado del transgén no logró revertir esta situación, los animales tTA/ΔNLS(sup)-6m también presentaron una penetrancia completa de este fenotipo *(Tabla 6).*

	Fenotipo de clasping (%)
Ctrol-6m	0 (0/29)
tTA/ΔNLS-6m	100 (23/23)‡
tTA/ΔNLS(sup)-6m	100 (12/12)‡

Tabla 6: Fenotipo de clasping en animales adultos.
‡p<0,001 diferencias significativas respecto a ratones Ctrol (Test de Kruskal–Wallis/prueba U de Mann–Whitney post hoc). El número de animales utilizados se indica entre paréntesis.

En el test de campo abierto, también encontramos en los animales bigénicos, con 6 meses de expresión, alteraciones conductuales como hiperlocomoción y disminución relativa de la distancia en el centro. De igual forma que en los otros tests, el tratamiento con Dox por 2 semanas no pudo rescatar estas conductas en el grupo suprimido *(Figura 42B-C).*

3.3 Neurodegeneración en ratones transgénicos de 6 meses de inducción

Debido a que ningún aspecto del fenotipo motor pudo ser rescatado por el protocolo de supresión, se decidió evaluar el nivel de atrofia cerebral en el grupo de ratones adultos con 6 meses de expresión. Se evaluó el ancho de la CSS, CM y el GD en ratones tTA/ΔNLS-6m y tTA/ΔNLS-6m(sup), a partir de cortes inmuno-marcados con NeuN. Como se observa en la *Figura 43*, los animales bigénicos presentaron una disminución marcada en el ancho cortical y del GD, indicando una robusta y extendida pérdida neuronal en las áreas analizadas, con valores significativamente menores a los de grupo control. Este efecto resultó particularmente evidente en la capa de células granulares del GD, donde prácticamente los ratones transgénicos presentan una monocapa neuronal *(Figura 43A)*. Cuando se analiza el efecto de la supresión del TDP-43 citoplasmático, puede observarse que el tratamiento con Dox por 2 semanas en los animales adultos no logra rescatar el proceso degenerativo. Al igual que con los ratones bigénicos no suprimidos, este efecto resulta más notorio en el GD del hipocampo. Para las regiones corticales analizadas, si bien se logra observar una cierta tendencia en la recuperación neuronal, las mediciones del ancho en CSS y MC resultan significativamente menores respecto al grupo control *(Figura 43B-C)*.

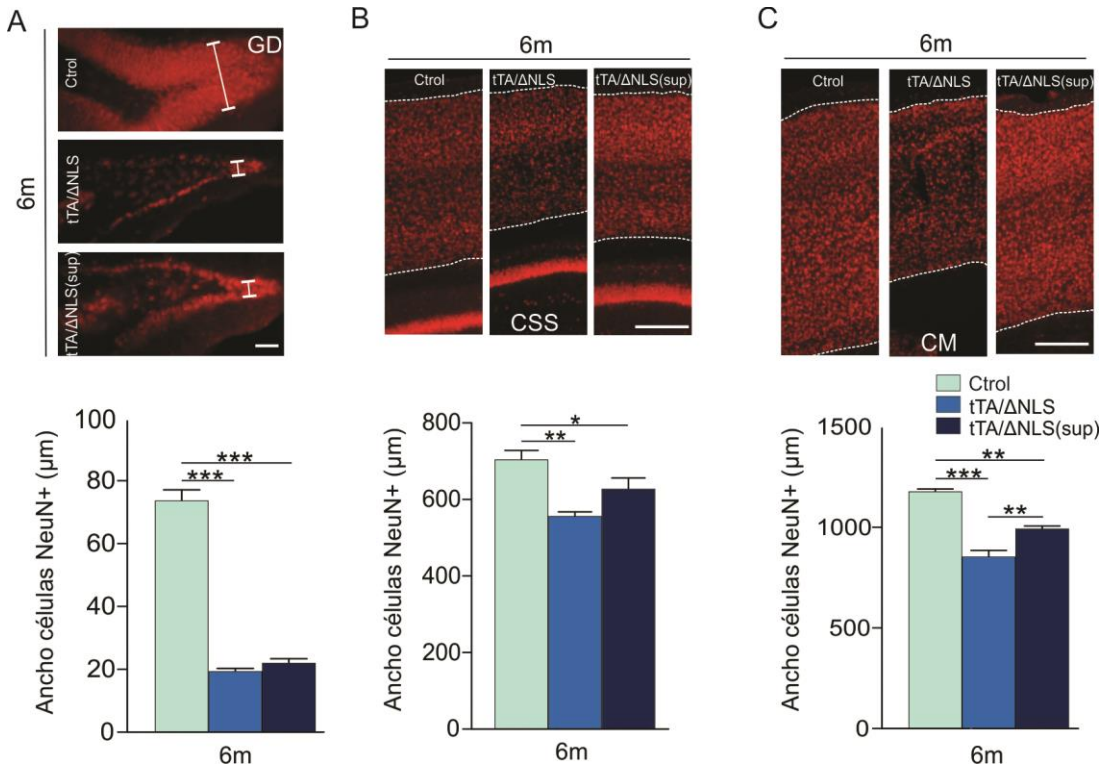

Figura 43: Marcada neurodegeneración en animales tTA/ΔNLS-6m.
*A-C. Inmunofluorescencia para el marcador neuronal NeuN en cortes coronales de cerebro de ratones Ctrol-6m, tTA/ΔNLS-6m y tTA/ΔNLS(sup)-6m (panel superior) y medición del ancho de la capa de células granulares del GD (A), CSS (B) y CM (C) (panel inferior). Los animales tTA/ΔNLS-6m y tTA/ΔNLS(sup)-6m mostraron una marcada pérdida neuronal en las regiones analizadas (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ANOVA de un factor/Newman–Keuls test post hoc, n = 5 por grupo). Barra de escala: A. 50 µm, B y C 250 µm. Los datos se expresan como media±SEM.*

Estos datos indican que una vez que ocurre un proceso neurodegenerativo masivo por la expresión a largo término del transgén, la eventual recuperación funcional por la eliminación del TDP-43 citoplasmático de las neuronas remanentes no sería suficiente para rescatar el fenotipo complejo instaurado en estos ratones adultos. Posiblemente en este estado avanzado del proceso patológico los circuitos neuronales ya se encuentran irreversiblemente afectados y, por lo tanto, no es posible obtener una recuperación funcional similar a la observada en animales jóvenes.

CUARTA PARTE:
Análisis de la expresión y activación de genes relacionados con fenómenos de actividad y plasticidad sináptica

1. Disminución de los niveles de expresión basal de los IEGs *zif268*, *c-fos* y *arc* en ratones bigénicos

En el sistema nervioso central, la expresión de los genes tempranos inmediatos (IEGs) se encuentra asociada a eventos de actividad neuronal reciente. Incluso existen evidencias claras del rol de dichos genes en fenómenos de plasticidad sináptica y procesos cognitivos, en particular, en aprendizaje y memoria (ver revisión en [103]). Por lo tanto, como un estudio de las bases moleculares y celulares del efecto de la sobreexpresión de hTDP-43-ΔNLS en los cambios conductuales y, principalmente, en las funciones cognitivas, se propuso analizar los niveles de expresión de marcadores moleculares asociados a plasticidad neuronal.

El análisis previo del transcriptoma mediante el uso de micro-arreglos ("microarrays" Affimetrix Mouse Genome 430A 2.0 Array, ver detalle en [77]) en ratones hTDP-43-ΔNLS luego de 2 semanas de inducción, evidenció cambios dramáticos de la expresión génica global en este modelo. Un aspecto interesante de esto fue la existencia de un efecto selectivo y significativo en la regulación positiva de genes relacionados con el ensamblado de la cromatina y genes de histonas, sugiriendo un novedoso mecanismo para TDP-43 en la regulación de los procesos de transcripción [77, 99].

A raíz de los importantes cambios transcripcionales observados debido a la sobreexpresión de hTDP-43-ΔNLS, se reanalizaron los datos crudos del estudio transcriptómico en busca de cambios en la expresión de IEGs. En la *Tabla 7* se muestran los niveles relativos (relación bigénico/control) de los ARN mensajeros para los tres genes tempranos inmediatos *zif268*, *c-fos* y *arc*, revelando una disminución significativa en la expresión de dichos genes respecto a los animales no transgénicos.

Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de hTDP-43-ΔNLS altera el patrón de expresión basal de genes tempranos inmediatos como *zif268*, *c-fos* y *arc*. Los cambios mencionados en la expresión génica podrían estar relacionados con las alteraciones conductuales observadas en estos ratones.

ARNm	Relación (tTA/ΔNLS)/Ctrol	p
zif268	0,738	0,0004
c-fos	0,637	0,0422
arc	0,396	0,0093

Tabla 7: Bajos niveles de expresión de zif268, c-fos y arc en ratones tTA/ΔNLS.
Análisis global del transcriptoma por micro-arreglos a partir de ARN cortical total obtenido de animales Ctrol y tTA/ΔNLS de 2 semanas de inducción. Se muestra la relación de expresión (bigénico/control) para tres IEGs asociados a plasticidad (zif268, c-fos y arc). Los animales tTA/ΔNLS presentan niveles significativamente disminuidos respecto a los ratones Ctrol. Para más detalle del análisis por micro-arreglos ver [77].

Para analizar si los IEGs también estaban alterados en sus niveles proteicos, se decidió estudiar el patrón de expresión basal de Zif268, un factor de transcripción inducible, cuya expresión resulta más característica de actividades sinápticas fisiológicas [115]. Para ello, se analizaron los niveles de expresión de la proteína Zif268 mediante inmunofluorescencia en regiones del cerebro involucradas en el procesamiento de las conductas alteradas, luego de 1 mes de inducción. Como se observa en la *Figura 44A*, los ratones control presentan una fuerte expresión de este IEG en las zonas corticales estudiadas (CSS, CM y CPFm) y en la región CA1 del hipocampo. La expresión de la variante citoplasmática de TDP-43 provoca una desregulación en los niveles proteicos de Zif268, disminuyendo en todas las áreas analizadas. La señal de Zif268 resultó ser, aproximadamente, entre un 60%-80% menor en los ratones hTDP-43-ΔNLS respecto a los animales control según la región evaluada *(Figura 44B-E)*.

2. Los ratones hTDP-43-ΔNLS presentan una respuesta anormal en la inducción de IEGs

Considerando que los niveles de expresión de *zif268*, *c-fos* y *arc* se encuentran disminuidos en condiciones basales en ratones hTDP-43-ΔNLS, se decidió estudiar la expresión de dichos marcadores tanto en animales naive como en aquellos sometidos a una tarea conductual que reclute la inducción de estos genes, para determinar si, además de sus niveles basales, también se encuentran afectados los mecanismos de regulación de la expresión por actividad y/o plasticidad.

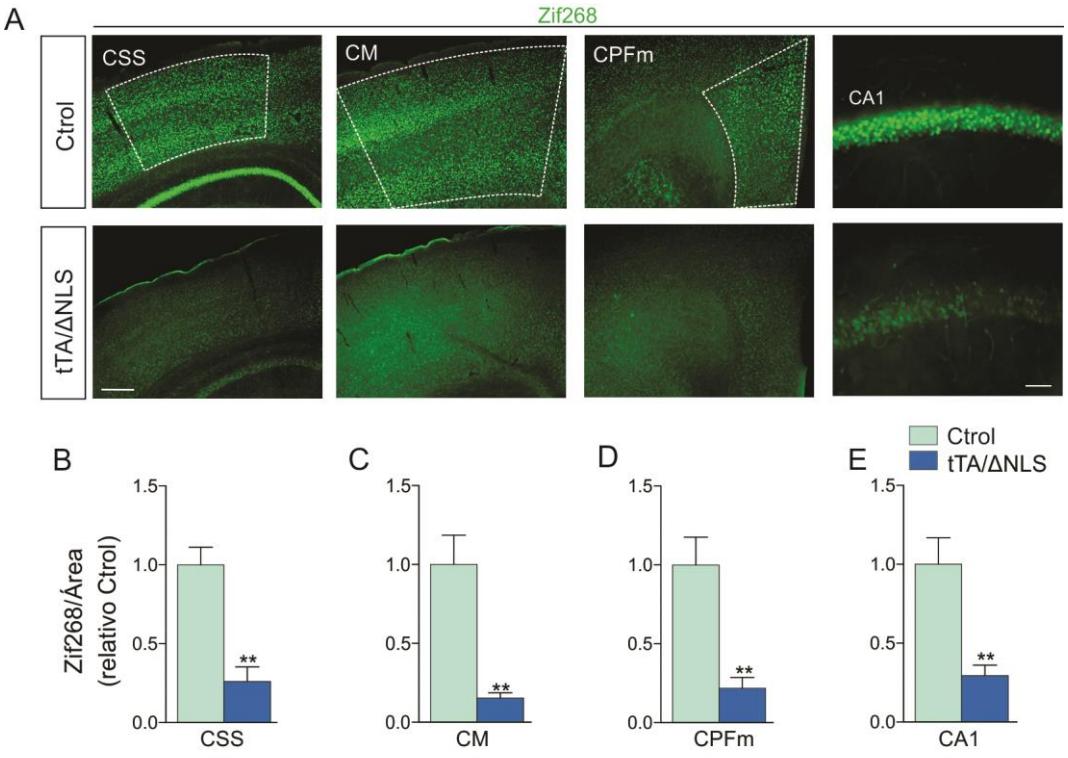

Figura 44: Niveles reducidos de Zif268 en ratones bigénicos hTDP-43-ΔNLS.
*A. Inmunofluorescencia para la proteína Zif268 en cortes coronales de cerebro de ratones Ctrol-1m y tTA/ΔNLS-1m. Se muestran fotografías representativas de las zonas analizadas: CSS, CM, CPFm y región CA1 del hipocampo. Barra de escala: 250 µm (CSS, CM y CPFm) y 50 µm (CA1). B-C. Cuantificación de la señal de Zif268 (intensidad/área, relativo al Ctrol) para cada región mostrada en A. Los animales tTA/ΔNLS presentan una disminución significativa de la señal de Zif268 para las regiones estudiadas (**p<0,01, diferencias significativas respecto al grupo Ctrol, prueba t de Student, n = 6 para cada grupo). Los datos se expresan como media±SEM.*

Dado que la exploración de ambientes novedosos induce la expresión de Zif268, c-Fos y Arc [154, 155], se decidió utilizar el paradigma del test de campo abierto para gatillar conductualmente la inducción de los IEGs. La expresión de Zif268, c-Fos y Arc se midió en animales Ctrol y bigénicos naive (sin exposición al ambiente novedoso), y en animales Ctrol y bigénicos expuestos al test de campo abierto por 20 minutos y sacrificados 1 hora post-test conductual (*Figura 45A*). Se llevaron a cabo métodos de inmunofluorescencia para detectar la señal de inducción de estos IEGs en diferentes regiones corticales (CSS, CM, CPFm, Cíngulo-Cg) e hipocampo (GD y CA1). En la *Figura 45B* pueden observarse fotos representativas de la inducción de Zif268 en respuesta a la exposición al ambiente novedoso para la CPFm y la región CA1 del hipocampo. La cuantificación de la señal de Zif268 de estas áreas, junto a la CSS y CM (medida como intensidad de la señal/área, normalizada al control naive) se puede ver en la *Figura 45C-F*. Los animales control mostraron una inducción significativa de Zif268 respecto a los animales naive para todas las regiones

estudiadas. El análisis mediante ANOVA de una vía reveló que los niveles inducidos por la novedad de Zif268 en CSS, CM, CPFm y CA1 fueron significativamente mayores en los animales control en relación con los niveles alcanzados por los animales transgénicos. A pesar de esto, los ratones hTDP-43-ΔNLS presentaron una inducción menor pero significativa en todas las áreas analizadas exceptuando la CM.

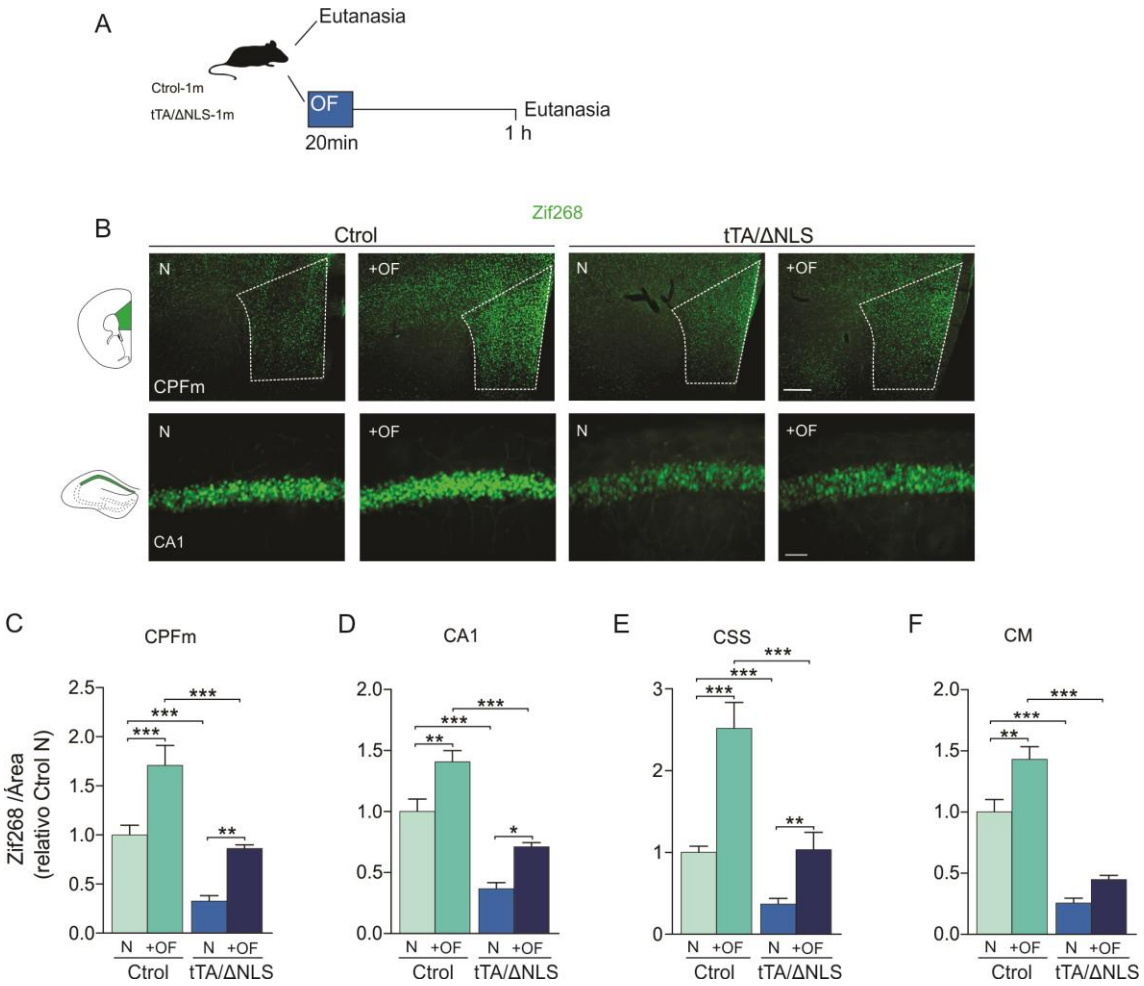

Figura 45: Inducción del IEG Zif268 en respuesta al ambiente novedoso.
*A. Diseño experimental: animales Ctrol-1m y tTA/ΔNLS-1m fueron expuestos al test de campo abierto como contexto novedoso (+OF) y sacrificados 1 hora post-test conductual. Estos animales fueron comparados con ratones naive (N) los cuales no fueron expuestos a la novedad. B. Inmunofluorescencia para la proteína Zif268 en cortes coronales de cerebro. Se muestran fotografías representativas de CPFm y región CA1 del hipocampo en condición naive y +OF para ratones Ctrol y bigénicos. Barra de escala: 250 µm CPFm y 50 µm CA1. C-F. Cuantificación de la señal de Zif268 (intensidad/área, relativo al Ctrol N) para CPFm (C), CA1 (D), CSS (E) y CM (F). **p<0,01, ***p<0,001, ANOVA de un factor/Newman–Keuls test post hoc, n = 6 - 8 por grupo. Los datos se expresan como media±SEM.*

En paralelo, se realizaron ensayos de inmunoblot a partir de fracciones de corteza total proveniente del otro hemisferio de los mismos ratones experimentales

(Figura 46A-B), confirmando que, en los ratones tTA/ΔNLS, hay una reducción de los niveles basales de expresión de Zif268 y que la exposición a la novedad no logra niveles de inducción comparables a los obtenidos en los animales control.

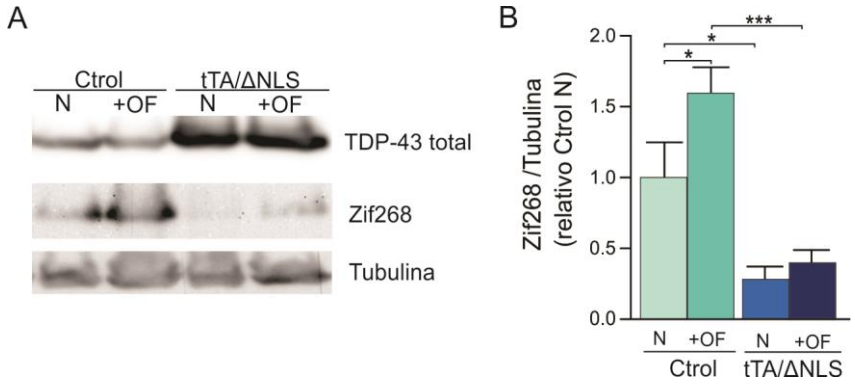

Figura 46: Análisis de la inducción de Zif268 por Western Blot.
*A. Inmunoblot para TDP-43 Total y Zif268 en extractos corticales en RIPA de animales control y tTA/ΔNLS en condiciones naive y +OF. Tubulina se utilizó como control de carga. D. Cuantificación del inmunoblot mostrado en A, *p<0,05, ***p<0,001, ANOVA de un factor/Newman–Keuls test post hoc, n = 5 para cada grupo. Los datos se expresan como media±SEM.*

En relación al análisis de c-Fos, en condiciones naive, no se observaron diferencias significativas entre los animales control y bigénicos en las regiones corticales analizadas *(Figura 47).* Sin embargo, en la zona de células granulares del GD (donde se pueden distinguir más claramente células individuales), se observó un mayor conteo de células c-Fos+ en ratones control respecto a los animales tTA/ΔNLS *(Figura 47A y C)*. Luego de la exposición al ambiente novedoso, los animales control mostraron un aumento significativo en la inducción de este IEG en CSS, CPFm, Cg y GD *(Figura 47A-E)*. Este efecto se puede observar claramente en la *Figura 47A* para la CPFm y el GD del hipocampo. Los ratones tTA/ΔNLS mostraron una tendencia similar, pero solo presentaron una activación significativa respecto a los valores naive en CPFm y Cg. Sin embargo, los niveles de inducción alcanzados fueron significativamente menores a los obtenidos por los animales control.

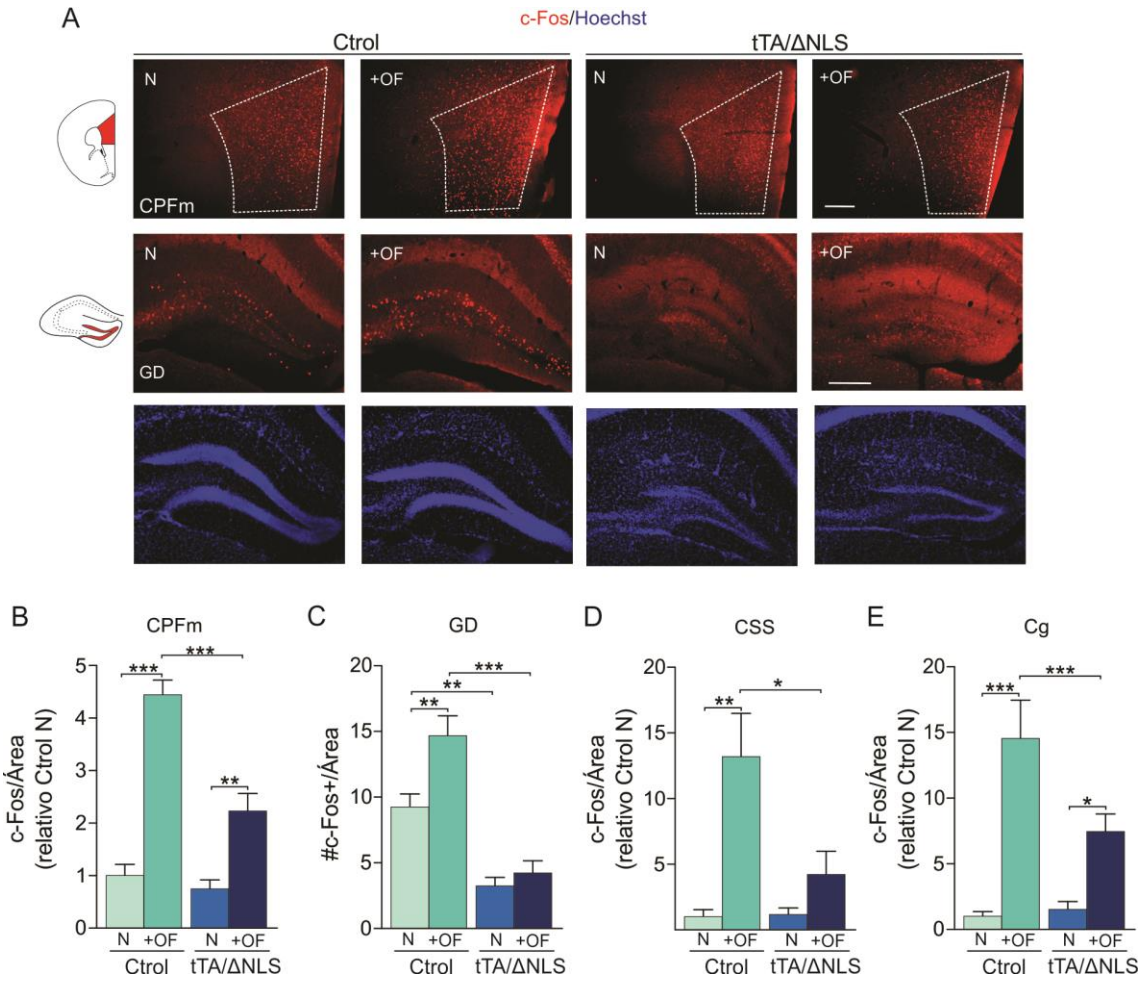

***Figura 47: La expresión* hTDP-43-ΔNLS modifica el patrón de inducción de c-Fos.**
*A. Diseño experimental: animales Ctrol-1m y tTA/ΔNLS-1m fueron expuestos al test de campo abierto como contexto novedoso (+OF) y sacrificados 1 hora post-test conductual. Estos animales fueron comparados con ratones naive (N) los cuales no fueron expuestos a la novedad. B. Inmunofluorescencia para la proteína c-Fos en cortes coronales de cerebro. Se muestran fotografías representativas de CPFm y GD del hipocampo en condición naive y +OF para ratones Ctrol y bigénicos. Barra de escala: 250 µm. B-E. Cuantificación de la señal de c-Fos (intensidad/área o número de células c-fos positivas, relativo al Ctrol N) para CPFm (B), GD (C), CSS (D) y Cg (E). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ANOVA de un factor/Newman–Keuls test post hoc, n = 6 - 8 por grupo. Los datos se expresan como media±SEM.*

El análisis de Arc evidenció una inducción significativa en CSS y GD en los ratones control luego del desafío conductual, mientras que los animales transgénicos para hTDP-43-ΔNLS no mostraron una activación significativa de Arc en las regiones analizadas *(Figura 48)*. En las otras áreas (CM, CPFm y Cg) los niveles basales de Arc eran tan bajos que no pudieron medirse. Respecto a los niveles basales, el número de células Arc positivas en el GD (donde la expresión basal de Arc es escasa pero claramente detectable) resultó significativamente menor en los animales bigénicos. De todos modos, no se observaron diferencias de la expresión de Arc en la CSS en

condiciones naive, en donde los niveles detectados de esta proteína fueron casi nulos para ambos grupos.

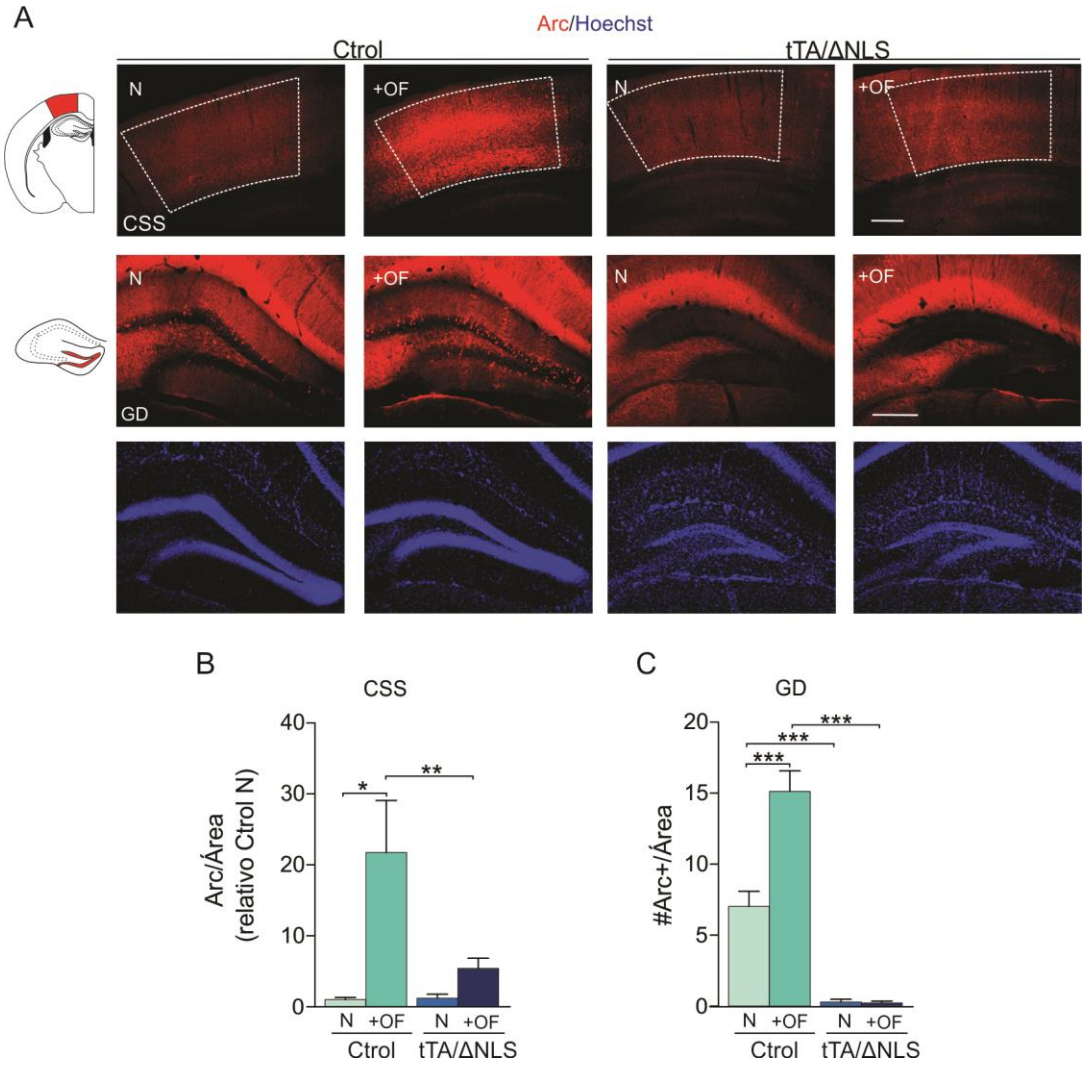

Figura 48: Inducción de Arc alterada en ratones tTA/ΔNLS.
*A. Diseño experimental: animales Ctrol-1m y tTA/ΔNLS-1m fueron expuestos al test de campo abierto como contexto novedoso (+OF) y sacrificados 1 hora post-test conductual. Estos animales fueron comparados con ratones naive (N) los cuales no fueron expuestos a la novedad. B. Inmunofluorescencia para la proteína Arc en cortes coronales de cerebro. Se muestran fotografías representativas de CSS y GD del hipocampo en condición naive y +OF para ratones Ctrol y bigénicos. Barra de escala: 250 µm. B-C. Cuantificación de la señal de Arc (intensidad/área o número de células ARC positivas, relativo al Ctrol N) para CSS (B) y GD (C). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ANOVA de un factor/Newman–Keuls test post hoc, n = 5 por grupo. Los datos se expresan como media±SEM.*

En consecuencia, tanto a nivel basal como durante la exploración, la activación neuronal revelada por la activación de IEGs parece estar comprometida en los ratones hTDP-43-ΔNLS. Resulta importante aclarar que si bien la inducción absoluta en los ratones control fue superior para todos los IEGs estudiados, la relación de activación que presentaron los animales tTA/ΔNLS fue, proporcionalmente respecto a la

condición naive, similar en algunos casos a los obtenidos por los animales control (ver *Figura 46,* Zif268: CSS, CA1 y CPFm; y *Figura 47*, c-Fos: CPFm). Esto sugiere que es necesario alcanzar un cierto nivel crítico de activación para lograr una respuesta neuronal adecuada.

En resumen, la sobreexpresión de la variante citoplasmática de TDP-43 provoca fuertes cambios en la expresión génica de nuestro modelo animal, en particular, los cambios mencionados involucran la afectación en la expresión basal de IEGs como *zif268*, *c-fos* y *arc*, y una baja o nula inducción frente a la exposición de una novedad conductual. La activación neuronal, evidenciada por la inducción de los IEGs en este modelo, parecería estar comprometida y, por lo tanto, algunos de los cambios conductuales observados en estos animales podrían estar relacionados con una disminución general de los niveles de actividad y/o activación neuronal, causada por la sobreexpresión de hTDP-43-ΔNLS.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

En este trabajo, se realizó una profunda evaluación conductual en ratones hTDP-43-ΔNLS y se estableció que se produce un proceso neurodegenerativo progresivo en varias regiones del cerebro afectadas. Asimismo, este modelo murino inducible nos permitió determinar si una vez establecido el fenotipo conductual alterado, este puede ser revertido por la supresión de la expresión del transgén. Sumado a esto, la restricción espacio-temporal en la expresión del transgén nos permitió estudiar la contribución de las neuronas del cerebro anterior en el proceso patológico, sin la participación y consecuencias de la expresión del transgén en motoneuronas inferiores.

Las principales conclusiones de este trabajo se resumen a continuación. Primero, se demostró que los ratones hTDP-43-ΔNLS presentan déficits conductuales relacionados con las proteinopatías de TDP-43, incluyendo anormalidades motoras, interacción social reducida y déficits cognitivos. Segundo, el restablecimiento de los niveles normales de TDP-43 por supresión del transgén logró revertir en ratones jóvenes las alteraciones motoras y sociales, llevando a una recuperación funcional en estos dominios conductuales. La reversibilidad de estos déficits luego del apagado del transgén sugiere que estos fenotipos alterados en los ratones hTDP-43-ΔNLS se deben, principalmente, a la expresión del mismo y no a efectos inespecíficos por su inserción en el genoma. Tercero, este trabajo indica que existe una neurodegeneración regional y dependiente del tiempo en los ratones transgénicos, incluyendo áreas relevantes para los dominios conductuales afectados. Cuarto, la supresión en la expresión del transgén en ratones adultos, que presentan una extensa neurodegeneración, no resulta suficiente para mejorar los déficits conductuales ya establecidos, indicando que se debe preservar un cierto número de neuronas para compensar las alteraciones causadas por la sobreexpresión de hTDP-43-ΔNLS. Quinto, la sobreexpresión de TDP-43 citoplasmático provoca importantes cambios en la expresión génica, incluyendo la alteración del patrón basal de expresión de genes tempranos inmediatos, como así también de su inducción frente a una tarea conductual. Los cambios en la expresión génica podrían estar relacionados con las alteraciones conductuales observadas en nuestro modelo. Estos resultados sugieren que, al menos en etapas tempranas, los déficits conductuales mediados por la sobreexpresión de TDP-43 estarían principalmente sustentados por alteraciones en la función y activación de las poblaciones neuronales afectadas. Dada la capacidad de reversión, el fenotipo conductual desarrollado sería inicialmente independiente de los fenómenos neurodegenerativos y, además, los diversos dominios conductuales podrían tener diferente grado de susceptibilidad a la recuperación y mejora.

En los últimos años, se ha reportado que la sobreexpresión de distintas especies de TDP-43 en modelos de ratón, rata y primates, mediante la utilización de vectores virales o transgénesis, genera un impacto en diferentes dominios conductuales. Esencialmente, esto afecta al dominio motor, y la mayoría de los modelos de DFT/ELA en roedores desarrollan disfunciones motoras que se establecen de forma temprana y de manera robusta [77, 95, 146, 156-159]. Las alteraciones en las funciones motoras, cognitivas y sociales observadas en nuestro modelo tienen poca correlación con los fenómenos de agregación y clivaje de TDP-43, debido a que la acumulación patológica de agregados y de fragmentos proteolíticos son mínimos o inexistentes en estos ratones [77]. Por otro lado, este fenotipo conductual se establece rápidamente luego de la inducción del transgén en ratones jóvenes, en ausencia de una neurodegeneración masiva. Más aún, luego de la supresión del transgén las funciones motoras y cognitivas se recuperan notablemente. Estos hallazgos enfatizan la noción de que estos déficits conductuales rápidamente establecidos en ratones jóvenes son, probablemente, el resultado de cambios en la funcionalidad normal de neuronas que expresan hTDP-43-ΔNLS, las cuales se mantienen vivas y participan en circuitos relevantes para sostener estas conductas, en lugar de ser causados por una mera pérdida de una población neuronal específica. En ratones adultos, la recuperación funcional por la eliminación del TDP-43 citoplasmático, no sería suficiente para rescatar el fenotipo complejo instaurado. Dado que la expresión continua del transgén durante 6 meses lleva a una evidente neurodegeneración, demostrado por la robusta atrofia cortical y del giro dentado, se podría especular que, en ese tiempo, se ha alcanzado un umbral crítico de pérdida neuronal, a partir del cual no resulta posible la renormalización de las funciones neuronales mediante la supresión del transgén. Sin embargo, es importante destacar que, aunque la ventana temporal utilizada en los estudios de supresión (2 semanas) fuese suficiente para revertir las conductas en animales jóvenes, se podrían requerir periodos de supresión mayores para recuperar las funciones conductuales en ratones expuestos a una extendida expresión del transgén.

Resulta cada vez más claro que en el espectro DFT/ELA no solo estarían alterados mecanismos relacionados con la homeostasis proteica, sino que también estarían involucradas fallas en la homeostasis del ARN [26, 160, 161]. Recientemente, ha sido descripto un importante rol citoplasmático de TDP-43 en el transporte axonal de gránulos de ARNm, predominantemente de forma anterógrada, desde el soma hasta compartimentos axonales distales [162]. Alteraciones en este proceso (ya sea por mutaciones o factores desconocidos) podrían tener una consecuencia directa en la degeneración selectiva de subtipos celulares, especialmente en neuronas. El modelo

animal utilizado en este trabajo podría ser de utilidad para dilucidar en vivo algunos de estos interrogantes, dado que la sobreexpresión reversible de una variante citoplasmática de TDP-43 podría modificar el ensamblado, distribución, composición y transporte de estos gránulos de ARNm, con implicancias directas en la función y sobrevida neuronal.

En los últimos años, ha habido una enorme actividad y esfuerzo aplicado al desarrollo de modelos animales para DFT/ELA, haciendo buen uso de los recientes hallazgos neuropatológicos y genéticos asociados a estas patologías [163-165]. En particular, se generaron ratones transgénicos basados en la modulación de la expresión de *C9ORF72*, *PGRN*, *VCP*, *CHMP2B* y otros genes, los cuales se encuentran disponibles para su comparación con la gran variedad de modelos en roedores basados en TDP-43. En este contexto, se está volviendo cada vez más difícil analizar aspectos comunes y diferencias entre los cambios neuropatológicos y conductuales asociados a los distintos modelos, planteando un desafío para este campo de estudio.

La presencia de alteraciones cognitivas y sociales consistentes con el espectro clínico de DFT/ELA han sido descriptas en otros modelos murinos de DFT [163], principalmente en aquellos basados en la proteína Tau, pero también en otros genes relacionados con DFT, incluyendo *PGRN*, *VCP* y *CHMP2B* entre otros. La sobreexpresión neuronal de una variante mutante patológica de la proteína *VCP* lleva a una acumulación progresiva (dependiente de la edad) de ubiquitina y TDP-43, y a alteraciones en las funciones cognitivas, incluyendo déficits en la memoria espacial, el reconocimiento de objetos y el condicionamiento al miedo [166]. Ratones deficientes en *PGRN*, que modelan la haploinsuficiencia de *PGRN* asociada a DFT, presentan cambios tempranos en las conductas sociales y tardíamente alteraciones en la memoria espacial, evaluada por medio del laberinto acuático de Morris. Estos déficits estuvieron asociados a cambios neuropatológicos como la acumulación de ubiquitina y TDP-43 fosforilado en el hipocampo [167]. Las anormalidades cognitivas y sociales también fueron recapituladas en otros modelos murinos de deficiencia de *PGRN* [168, 169]. Recientemente, se ha descripto una línea murina transgénica que expresa la variante humana mutante $CHMP2B^{intron5}$ específicamente en neuronas. Este modelo desarrolla de forma progresiva alteraciones conductuales asociadas a DFT como desinhibición, disminución en la interacción social, compulsividad y estereotipias [170]. En otro estudio, la expresión dirigida a cerebro anterior de una forma mutante de Tau (hTauP301L + R406W) mostró un fenotipo relacionado a DFT, incluyendo afectación en la memoria semántica, ansiedad y anhedonia [171]. Algunos modelos transgénicos basados en TDP-43 también presentan diferentes grados de alteraciones cognitivas,

incluyendo aquellos modelos de sobreexpresión de variantes mutantes, fragmentos C-terminales o incluso de la forma salvaje de TDP-43 [95, 146, 157, 158, 172]. Notablemente, no ha sido descripta previamente la presencia de déficits sociales en modelos de DFT basados en TDP-43, estableciendo de esta manera a la línea hTDP-43-ΔNLS como la primera descripción de alteraciones sociales en un modelo de este tipo, proporcionando una plataforma para el estudio de este fenotipo no reversible, que se establece de forma temprana.

Recientemente, Walker y colaboradores desarrollaron una línea transgénica TDP-43-ΔNLS de expresión regulable dirigida a neuronas, bajo el control del promotor de la subunidad pesada de neurofilamento (*NEFH*, por sus siglas en inglés), acoplado al mismo sistema de prendido y apagado dependiente de tetraciclina (tet-Off) que el utilizado en este estudio. A pesar de que estos ratones desarrollan rápidamente neuropatología y déficits motores consistentes con los cambios observados en ELA, estas alteraciones motoras tempranas y robustas, dificultan el estudio del fenotipo cognitivo y social más comúnmente asociado a DFT [97]. Nuestro modelo en estudio también desarrolla alteraciones en las conductas motoras que se establecen al corto tiempo luego de la inducción del transgén. Sin embargo, los animales fueron capaces de llevar a cabo las tareas conductuales de forma apropiada, como lo indican los experimentos controles. Es interesante destacar que estudios desarrollados en nuestro laboratorio indican que la línea hTDP-43-WT12 [77], con la proteína humana salvaje bajo el mismo sistema de expresión que el utilizado en el animal hTDP-43-ΔNLS descripto en esta tesis, presenta un fenotipo temprano de déficits sociales y cognitivos en ausencia de alteraciones motoras, constituyendo un modelo complementario al hTDP-43-ΔNLS para el estudio del espectro DFT/ELA [173].

Aunque la búsqueda y selección de ensayos conductuales para una caracterización adecuada de modelos murinos de DFT pareciera ser una tarea difícil, existen varias características típicas de esta patología que son susceptibles al análisis conductual en roedores. Por ejemplo, la disfunción social es una característica de DFT que puede ser estudiada en ratones por medio de tests específicos, cuya utilidad ya fue probada en otros desórdenes con déficits sociales prominentes como el autismo [141]. Otro síntoma cuyo estudio resulta de interés son las conductas repetitivas, un hallazgo clínico a menudo observado en DFT y que puede llegar a ser incapacitante [174]. En este trabajo, se analizaron ambos dominios para el entendimiento integral de las anormalidades conductuales presentes en nuestro modelo. Estudios recientes en pacientes con DFT describen procesos de degeneración en el cuerpo estriado [175], una estructura subcortical relevante para el procesamiento social y emocional [176, 177]. En nuestro modelo en estudio, el promotor CaMKII también dirige la expresión

del transgén en neuronas estriatales, hecho que puede contribuir potencialmente a alguno de los déficits descriptos. Las alteraciones en el procesamiento del miedo también pueden ser estudiadas en modelos murinos mediante el test de condicionamiento al miedo y otros paradigmas aversivos que evalúan la disfunción de la amígdala, lo cual también está asociado a DFT [178]. Los ratones hTDP-43-ΔNLS presentan una respuesta anormal asociada al miedo evaluada por el test de evitación inhibitoria, una tarea aversiva dependiente del hipocampo y la amígdala [179].

Una de las limitaciones de nuestro modelo es causada por la misma razón que le otorga especificidad regional a la expresión del transgén. Aunque el uso del promotor CaMKIIα (que provee un patrón de expresión enriquecido en neuronas de cerebro anterior) nos permite generar una estrategia más limpia que el uso de promotores de expresión neuronal general, esto también introduce un sesgo en los efectos conductuales provocados por la expresión del transgén. Sin duda, sería de mucha utilidad comparar la toxicidad y cambios funcionales provocados por la expresión del transgén en una población celular diferente (por ejemplo, motoneuronas de la médula espinal). Aunque algunas de las herramientas de transgénesis necesarias para emprender estos estudios están actualmente disponibles, estos modelos pueden proporcionar escasa o limitada información debido a la letalidad temprana o efectos pleiotrópicos que pueden oscurecer la interpretación de los resultados conductuales.

El efecto notablemente rápido de la expresión del transgén sobre varios dominios conductuales nos lleva a proponer que las funciones normales de TDP-43 están siendo perturbadas por hTDP-43-ΔNLS y esto conlleva a una funcionalidad alterada de las neuronas afectadas. Aunque se ha demostrado tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* que la expresión de TDP-43-ΔNLS es primariamente citoplasmática [16, 77, 97, 145, 172], no puede descartarse que una expresión residual nuclear del transgén pueda contribuir al fenotipo observado en el modelo en estudio. Varios trabajos demuestran que la manipulación de los niveles o locación subcelular de TDP-43 tiene un impacto profundo en los niveles de ARNm/microARN y en los patrones de corte y empalme (*splicing*) de distintos ARNm [22, 23]. TDP-43 interactúa con más de 6000 ARN y su knockdown altera el patrón de splicing de más de 950 trascriptos [22, 23, 77, 180-182]. Sumado a esto, dado que la supresión del transgén revierte algunos déficits conductuales y detiene la neurodegeneración en regiones del cerebro afectadas, se puede interpretar que la mayoría de las neuronas que expresan hTDP-43-ΔNLS son capaces de recuperarse luego de la supresión y sostener correctamente las conductas analizadas, cuando estas pertenecen a circuitos o estructuras que no han sufrido una neurodegeneración masiva (como se observa en ratones jóvenes).

Este no sería el caso en los animales que presentan una severa pérdida neuronal (como los ratones de 6 meses de expresión) y no pueden revertir a un fenotipo normal luego de la supresión. Esta hipótesis aquí planteada podría ser evaluada con mayor profundidad en este modelo animal por medio de estudios electrofisiológicos tanto *in vitro* como *in vivo*.

Otro punto que debe tenerse en cuenta es que, aunque relativamente escasa, existe evidencia que indica que la modulación de los niveles de TDP-43 cambia aspectos específicos de las neuronas, como ser propiedades bioquímicas, morfológicas y electrofisiológicas. Algunos autores proponen a TDP-43 como un factor respondedor a la actividad neuronal, sugiriendo un rol en el transporte y traducción de ARNm en dendritas [129] y axones [162]. Evidencias recientes muestran que TDP-43 podría alterar la morfología y conectividad neuronal vía la regulación de procesos de espinogénesis y extensión de neuritas a través de la GTPasa pequeña Rac1 y Rho respectivamente [183, 184]. En general, se cree que la desregulación de la actividad neuronal y de las funciones sinápticas causan varios tipos de trastornos cognitivos, incluyendo autismo, esquizofrenia y distintos tipos de demencia, ya que estas enfermedades están relacionadas con mutaciones en genes asociados con la expresión de genes dependientes de la actividad y la maduración sináptica [185, 186].

Los ratones hTDP-43-ΔNLS presentan una alteración global en el patrón de expresión génica en comparación con ratones no transgénicos, con más de 4700 genes que se encuentran expresados diferencialmente [77]. En este trabajo, se observó que el patrón de expresión basal de los IEGs Zif268, c-Fos y Arc se encontró alterado en este modelo en diferentes regiones corticales e hipocampo. La expresión de estos genes es regulada dinámicamente en respuesta a la actividad neuronal en el cerebro [120, 154], por lo que esta hipo-actividad basal generalizada de los IEGs por la sobreexpresión de hTDP-43-ΔNLS podría estar relacionada directamente con las alteraciones conductuales observadas. En el presente trabajo no solo se observaron disminuidos los niveles basales de Zif268, c-Fos y Arc, sino que también su inducción se encontró comprometida luego de la exposición a un ambiente novedoso (test de campo abierto). A pesar de los niveles basales alterados, los ratones hTDP-43-ΔNLS fueron en general capaces de aumentar los niveles de Zif268 y c-Fos en respuesta al ambiente novedoso. Sin embargo, el nivel de inducción por novedad de los IEGs no alcanzó los mismos niveles que los observados para los ratones control. Esto podría indicar que se requeriría un nivel crítico de inducción de estos genes, por debajo del cual no es posible obtener una respuesta celular adecuada. Dado que Zif268 y c-Fos son proteínas reguladoras que actúan como factores de transcripción [103], se podrían estudiar los cambios de expresión de sus genes blanco para evaluar, más en

profundidad, los niveles de inducción necesarios para una correcta activación neuronal. Por su parte, la expresión de Arc es dinámica y se encuentra altamente asociada a eventos de plasticidad neuronal y funciones cognitivas [103, 120, 187]. Ratones depletados de Arc desarrollan déficits en la memoria espacial, memoria asociada al miedo y reconocimiento de objetos [122]. Por este motivo, se cree que la nula respuesta de Arc frente a la exposición al ambiente novedoso en nuestro modelo, podría contribuir notablemente con los déficits conductuales encontrados en los ratones bigénicos ΔNLS. Un análisis más profundo en cuanto al patrón de expresión e inducción de los IEGs en la línea hTDP-43-ΔNLS resulta necesario para lograr una mayor comprensión de su participación en el establecimiento del fenotipo conductual alterado.

Actualmente, los modelos animales juegan un rol central en la investigación de los mecanismos fisiológicos y patológicos, y fenotipos conductuales involucrados en los procesos neurodegenerativos. Son utilizados tanto para el estudio de las bases neurobiológicas de distintas patologías como para el desarrollo de nuevos tratamientos. En este contexto, la validez de un modelo cobra importancia, ya que no se valida el modelo en sí sino la interpretación de los datos obtenidos del mismo. Cuando se examina dicha validez deben considerarse principalmente 3 aspectos: la validez aparente, la validez de constructo y la validez predictiva [188, 189]. Para obtener una alta validez aparente, el modelo debe presentar una similitud entre los fenotipos neurológicos y conductuales, observados en pacientes humanos. En este punto, la línea hTDP-43-ΔNLS recapitula una serie de características neuropatológicas y conductuales asociadas a DFT-EMN, incluyendo neurodegeneración selectiva, formación de agregados proteicos de TDP-43 (baja cantidad detectada), disminución de los niveles endógenos de TDP-43, neuroinflamación progresiva [77], anormalidades en las conductas motoras, interacción social reducida y déficits cognitivos, otorgándole una alta validez aparente. Por otra parte, la validez de constructo refleja el grado de consistencia en la justificación teórica durante el diseño del modelo, como ser los cambios moleculares y celulares que resultan de la manipulación genética, de forma de modelar la verdadera naturaleza de la patología [190]. El modelo caracterizado en este trabajo está basado en la expresión, dirigida a cerebro anterior, de una variante de localización citoplasmática de TDP-43. Como se mencionó anteriormente, una de las características patológicas en DFT/ELA es la pérdida de localización nuclear de TDP-43 en las células afectadas, evento que podría tener un papel importante en la neurodegeneración mediada por TDP-43 debido a la pérdida de sus funciones nucleares esenciales [47]. Si bien en este caso se está forzando la localización citoplasmática del transgén, por mutación de la secuencia de localización nuclear, es

importante mencionar que actualmente se desconocen los mecanismos que disparan la relocalización de TDP-43 al citoplasma en los casos patológicos. Por lo tanto, podría considerarse que la estrategia utilizada en los animales tTA/ΔNLS es adecuada, considerando las limitaciones de la sobreexpresión de una proteína en un modelo animal. Por último, si se desarrolla un modelo válido para una patología, este debe responder al tratamiento farmacológico de la misma forma que respondería una persona afectada, teniendo de esta forma una alta validez predictiva. Los ratones hTDP-43-ΔNLS, como muchos otros modelos de enfermedades neurodegenerativas, presentan una baja validez predictiva. Sin embargo, esta característica se relaciona con la disponibilidad de solo unos pocos compuestos de baja eficacia para el tratamiento y a la alta tasa de fracaso de nuevas drogas en ensayos clínicos. Cabe aclarar que ningún modelo animal resulta válido para todas las situaciones y propósitos, la validez se encuentra restringida a un uso específico del modelo y, en consecuencia, debe ser siempre abierto a la discusión y reevaluación.

En resumen, es posible proponer que los ratones hTDP-43-ΔNLS constituyen un novedoso y útil modelo de proteinopatías de TDP-43, tales como DFT-TDP y DFT-EMN, y podría proporcionar una plataforma versátil para la realización de estudios farmacológicos, electrofisiológicos y conductuales que permitan una mejor comprensión de la patofisiología de estas enfermedades devastadoras e incurables.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

1. Brettschneider, J., et al., *Spreading of pathology in neurodegenerative diseases: a focus on human studies.* Nat Rev Neurosci, 2015. **16**(2): p. 109-20.
2. Skovronsky, D.M., V.M. Lee, and J.Q. Trojanowski, *Neurodegenerative diseases: new concepts of pathogenesis and their therapeutic implications.* Annu Rev Pathol, 2006. **1**: p. 151-70.
3. Glenner, G.G. and C.W. Wong, *Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein.* Biochem Biophys Res Commun, 1984. **120**(3): p. 885-90.
4. Kosik, K.S., C.L. Joachim, and D.J. Selkoe, *Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(11): p. 4044-8.
5. Spillantini, M.G., et al., *alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(11): p. 6469-73.
6. Neumann, M., et al., *Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis.* Science, 2006. **314**(5796): p. 130-3.
7. Jucker, M. and L.C. Walker, *Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases.* Nature, 2013. **501**(7465): p. 45-51.
8. Aguzzi, A. and L. Rajendran, *The transcellular spread of cytosolic amyloids, prions, and prionoids.* Neuron, 2009. **64**(6): p. 783-90.
9. Polymenidou, M. and D.W. Cleveland, *Prion-like spread of protein aggregates in neurodegeneration.* J Exp Med, 2012. **209**(5): p. 889-93.
10. Guo, J.L. and V.M. Lee, *Cell-to-cell transmission of pathogenic proteins in neurodegenerative diseases.* Nat Med, 2014. **20**(2): p. 130-8.
11. Ciechanover, A., *Intracellular protein degradation: from a vague idea through the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting.* Bioorg Med Chem, 2013. **21**(12): p. 3400-10.
12. Ciechanover, A. and Y.T. Kwon, *Degradation of misfolded proteins in neurodegenerative diseases: therapeutic targets and strategies.* Exp Mol Med, 2015. **47**: p. e147.
13. Demuro, A., et al., *Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers.* J Biol Chem, 2005. **280**(17): p. 17294-300.
14. Wang, I.F., N.M. Reddy, and C.K. Shen, *Higher order arrangement of the eukaryotic nuclear bodies.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(21): p. 13583-8.
15. Ayala, Y.M., et al., *Structural determinants of the cellular localization and shuttling of TDP-43.* J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 22): p. 3778-85.
16. Winton, M.J., et al., *Disturbance of nuclear and cytoplasmic TAR DNA-binding protein (TDP-43) induces disease-like redistribution, sequestration, and aggregate formation.* J Biol Chem, 2008. **283**(19): p. 13302-9.
17. Buratti, E. and F.E. Baralle, *Characterization and functional implications of the RNA binding properties of nuclear factor TDP-43, a novel splicing regulator of CFTR exon 9.* J Biol Chem, 2001. **276**(39): p. 36337-43.
18. Buratti, E., et al., *TDP-43 binds heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B through its C-terminal tail: an important region for the inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator exon 9 splicing.* J Biol Chem, 2005. **280**(45): p. 37572-84.
19. Ou, S.H., et al., *Cloning and characterization of a novel cellular protein, TDP-43, that binds to human immunodeficiency virus type 1 TAR DNA sequence motifs.* J Virol, 1995. **69**(6): p. 3584-96.
20. Buratti, E. and F.E. Baralle, *TDP-43: gumming up neurons through protein-protein and protein-RNA interactions.* Trends Biochem Sci, 2012. **37**(6): p. 237-47.
21. Polymenidou, M., et al., *Misregulated RNA processing in amyotrophic lateral sclerosis.* Brain Res, 2012. **1462**: p. 3-15.
22. Polymenidou, M., et al., *Long pre-mRNA depletion and RNA missplicing contribute to neuronal vulnerability from loss of TDP-43.* Nat Neurosci, 2011. **14**(4): p. 459-68.
23. Tollervey, J.R., et al., *Characterizing the RNA targets and position-dependent splicing regulation by TDP-43.* Nat Neurosci, 2011. **14**(4): p. 452-8.

24. Lukavsky, P.J., et al., *Molecular basis of UG-rich RNA recognition by the human splicing factor TDP-43.* Nat Struct Mol Biol, 2013. **20**(12): p. 1443-9.
25. Ling, J.P., et al., *TDP-43 repression of nonconserved cryptic exons is compromised in ALS-FTD.* Science, 2015. **349**(6248): p. 650-5.
26. Ling, S.C., M. Polymenidou, and D.W. Cleveland, *Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis.* Neuron, 2013. **79**(3): p. 416-38.
27. Sephton, C.F., et al., *TDP-43 is a developmentally regulated protein essential for early embryonic development.* J Biol Chem, 2010. **285**(9): p. 6826-34.
28. Wu, L.S., et al., *TDP-43, a neuro-pathosignature factor, is essential for early mouse embryogenesis.* Genesis, 2010. **48**(1): p. 56-62.
29. Ayala, Y.M., et al., *TDP-43 regulates its mRNA levels through a negative feedback loop.* EMBO J, 2011. **30**(2): p. 277-88.
30. Avendano-Vazquez, S.E., et al., *Autoregulation of TDP-43 mRNA levels involves interplay between transcription, splicing, and alternative polyA site selection.* Genes Dev, 2012. **26**(15): p. 1679-84.
31. Irwin, D.J., et al., *Frontotemporal lobar degeneration: defining phenotypic diversity through personalized medicine.* Acta Neuropathol, 2015. **129**(4): p. 469-91.
32. Neary, D., et al., *Frontotemporal lobar degeneration: a consensus on clinical diagnostic criteria.* Neurology, 1998. **51**(6): p. 1546-54.
33. Ng, A.S., R. Rademakers, and B.L. Miller, *Frontotemporal dementia: a bridge between dementia and neuromuscular disease.* Ann N Y Acad Sci, 2015. **1338**: p. 71-93.
34. Lomen-Hoerth, C., T. Anderson, and B. Miller, *The overlap of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia.* Neurology, 2002. **59**(7): p. 1077-9.
35. Lillo, P. and J.R. Hodges, *Frontotemporal dementia and motor neurone disease: overlapping clinic-pathological disorders.* J Clin Neurosci, 2009. **16**(9): p. 1131-5.
36. Bigio, E.H., *TDP-43 variants of frontotemporal lobar degeneration.* J Mol Neurosci, 2011. **45**(3): p. 390-401.
37. Forman, M.S., et al., *Frontotemporal dementia: clinicopathological correlations.* Ann Neurol, 2006. **59**(6): p. 952-62.
38. Lattante, S., et al., *Defining the genetic connection linking amyotrophic lateral sclerosis (ALS) with frontotemporal dementia (FTD).* Trends Genet, 2015. **31**(5): p. 263-73.
39. Jones, C.T., et al., *Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) mutations and sporadic amyotrophic lateral sclerosis.* Lancet, 1993. **342**(8878): p. 1050-1.
40. Neumann, M., *Frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis: molecular similarities and differences.* Rev Neurol (Paris), 2013. **169**(10): p. 793-8.
41. Geser, F., et al., *Clinical and pathological continuum of multisystem TDP-43 proteinopathies.* Arch Neurol, 2009. **66**(2): p. 180-9.
42. Geser, F., et al., *Pathological TDP-43 in parkinsonism-dementia complex and amyotrophic lateral sclerosis of Guam.* Acta Neuropathol, 2008. **115**(1): p. 133-45.
43. Josephs, K.A., et al., *Staging TDP-43 pathology in Alzheimer's disease.* Acta Neuropathol, 2014. **127**(3): p. 441-50.
44. Arai, T., et al., *Phosphorylated TDP-43 in Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies.* Acta Neuropathol, 2009. **117**(2): p. 125-36.
45. Higashi, S., et al., *Concurrence of TDP-43, tau and alpha-synuclein pathology in brains of Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies.* Brain Res, 2007. **1184**: p. 284-94.
46. Kwong, L.K., et al., *TDP-43 proteinopathies: neurodegenerative protein misfolding diseases without amyloidosis.* Neurosignals, 2008. **16**(1): p. 41-51.
47. Lee, E.B., V.M. Lee, and J.Q. Trojanowski, *Gains or losses: molecular mechanisms of TDP43-mediated neurodegeneration.* Nat Rev Neurosci, 2012. **13**(1): p. 38-50.
48. Mackenzie, I.R., R. Rademakers, and M. Neumann, *TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia.* Lancet Neurol, 2010. **9**(10): p. 995-1007.
49. Lagier-Tourenne, C. and D.W. Cleveland, *Rethinking ALS: the FUS about TDP-43.* Cell, 2009. **136**(6): p. 1001-4.
50. Ling, S.C., et al., *ALS-associated mutations in TDP-43 increase its stability and promote TDP-43 complexes with FUS/TLS.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(30): p. 13318-23.
51. DeJesus-Hernandez, M., et al., *Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS.* Neuron, 2011. **72**(2): p. 245-56.

52. Renton, A.E., et al., *A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD.* Neuron, 2011. **72**(2): p. 257-68.
53. Cruts, M., S. Kumar-Singh, and C. Van Broeckhoven, *Progranulin mutations in ubiquitin-positive frontotemporal dementia linked to chromosome 17q21.* Curr Alzheimer Res, 2006. **3**(5): p. 485-91.
54. Watts, G.D., et al., *Novel VCP mutations in inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia.* Clin Genet, 2007. **72**(5): p. 420-6.
55. Van Deerlin, V.M., et al., *TARDBP mutations in amyotrophic lateral sclerosis with TDP-43 neuropathology: a genetic and histopathological analysis.* Lancet Neurol, 2008. **7**(5): p. 409-16.
56. Pesiridis, G.S., V.M. Lee, and J.Q. Trojanowski, *Mutations in TDP-43 link glycine-rich domain functions to amyotrophic lateral sclerosis.* Hum Mol Genet, 2009. **18**(R2): p. R156-62.
57. Sreedharan, J., et al., *TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis.* Science, 2008. **319**(5870): p. 1668-72.
58. Al-Sarraj, S., et al., *p62 positive, TDP-43 negative, neuronal cytoplasmic and intranuclear inclusions in the cerebellum and hippocampus define the pathology of C9orf72-linked FTLD and MND/ALS.* Acta Neuropathol, 2011. **122**(6): p. 691-702.
59. Mann, D.M., et al., *Dipeptide repeat proteins are present in the p62 positive inclusions in patients with frontotemporal lobar degeneration and motor neurone disease associated with expansions in C9ORF72.* Acta Neuropathol Commun, 2013. **1**: p. 68.
60. Zhang, Y.J., et al., *Aggregation-prone c9FTD/ALS poly(GA) RAN-translated proteins cause neurotoxicity by inducing ER stress.* Acta Neuropathol, 2014. **128**(4): p. 505-24.
61. Cairns, N.J., et al., *TDP-43 in familial and sporadic frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin inclusions.* Am J Pathol, 2007. **171**(1): p. 227-40.
62. Chen-Plotkin, A.S., V.M. Lee, and J.Q. Trojanowski, *TAR DNA-binding protein 43 in neurodegenerative disease.* Nat Rev Neurol, 2010. **6**(4): p. 211-20.
63. Brandmeir, N.J., et al., *Severe subcortical TDP-43 pathology in sporadic frontotemporal lobar degeneration with motor neuron disease.* Acta Neuropathol, 2008. **115**(1): p. 123-31.
64. Geser, F., et al., *Evidence of multisystem disorder in whole-brain map of pathological TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis.* Arch Neurol, 2008. **65**(5): p. 636-41.
65. Giordana, M.T., et al., *TDP-43 redistribution is an early event in sporadic amyotrophic lateral sclerosis.* Brain Pathol, 2010. **20**(2): p. 351-60.
66. Igaz, L.M., et al., *Expression of TDP-43 C-terminal Fragments in Vitro Recapitulates Pathological Features of TDP-43 Proteinopathies.* J Biol Chem, 2009. **284**(13): p. 8516-24.
67. Pesiridis, G.S., et al., *A "two-hit" hypothesis for inclusion formation by carboxyl-terminal fragments of TDP-43 protein linked to RNA depletion and impaired microtubule-dependent transport.* J Biol Chem, 2011. **286**(21): p. 18845-55.
68. Nishimoto, Y., et al., *Characterization of alternative isoforms and inclusion body of the TAR DNA-binding protein-43.* J Biol Chem, 2010. **285**(1): p. 608-19.
69. Dormann, D., et al., *Proteolytic processing of TAR DNA binding protein-43 by caspases produces C-terminal fragments with disease defining properties independent of progranulin.* J Neurochem, 2009. **110**(3): p. 1082-94.
70. Zhang, Y.J., et al., *Progranulin mediates caspase-dependent cleavage of TAR DNA binding protein-43.* J Neurosci, 2007. **27**(39): p. 10530-4.
71. Igaz, L.M., et al., *Enrichment of C-terminal fragments in TAR DNA-binding protein-43 cytoplasmic inclusions in brain but not in spinal cord of frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis.* Am J Pathol, 2008. **173**(1): p. 182-94.
72. Nonaka, T., et al., *Truncation and pathogenic mutations facilitate the formation of intracellular aggregates of TDP-43.* Hum Mol Genet, 2009. **18**(18): p. 3353-64.
73. Nishihira, Y., et al., *Sporadic amyotrophic lateral sclerosis of long duration is associated with relatively mild TDP-43 pathology.* Acta Neuropathol, 2009. **117**(1): p. 45-53.
74. Wegorzewska, I., et al., *TDP-43 mutant transgenic mice develop features of ALS and frontotemporal lobar degeneration.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(44): p. 18809-14.
75. Wils, H., et al., *TDP-43 transgenic mice develop spastic paralysis and neuronal inclusions characteristic of ALS and frontotemporal lobar degeneration.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(8): p. 3858-63.

76. Xu, Y.F., et al., *Wild-type human TDP-43 expression causes TDP-43 phosphorylation, mitochondrial aggregation, motor deficits, and early mortality in transgenic mice.* J Neurosci, 2010. **30**(32): p. 10851-9.
77. Igaz, L.M., et al., *Dysregulation of the ALS-associated gene TDP-43 leads to neuronal death and degeneration in mice.* J Clin Invest, 2011. **121**(2): p. 726-38.
78. Casafont, I., et al., *TDP-43 localizes in mRNA transcription and processing sites in mammalian neurons.* J Struct Biol, 2009. **167**(3): p. 235-41.
79. Wong, P.C. and D.R. Borchelt, *Motor neuron disease caused by mutations in superoxide dismutase 1.* Curr Opin Neurol, 1995. **8**(4): p. 294-301.
80. Ripps, M.E., et al., *Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(3): p. 689-93.
81. Puzzo, D., et al., *Rodent models for Alzheimer's disease drug discovery.* Expert Opin Drug Discov, 2015. **10**(7): p. 703-11.
82. Giraldez-Perez, R., et al., *Models of alpha-synuclein aggregation in Parkinson's disease.* Acta Neuropathol Commun, 2014. **2**: p. 176.
83. Chang, R., et al., *Transgenic animal models for study of the pathogenesis of Huntington's disease and therapy.* Drug Des Devel Ther, 2015. **9**: p. 2179-88.
84. Li, Y., et al., *A Drosophila model for TDP-43 proteinopathy.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(7): p. 3169-74.
85. Ihara, R., et al., *RNA binding mediates neurotoxicity in the transgenic Drosophila model of TDP-43 proteinopathy.* Hum Mol Genet, 2013.
86. Ash, P.E., et al., *Neurotoxic effects of TDP-43 overexpression in C. elegans.* Hum Mol Genet, 2010. **19**(16): p. 3206-18.
87. Liachko, N.F., C.R. Guthrie, and B.C. Kraemer, *Phosphorylation promotes neurotoxicity in a Caenorhabditis elegans model of TDP-43 proteinopathy.* J Neurosci, 2010. **30**(48): p. 16208-19.
88. Kabashi, E., et al., *Gain and loss of function of ALS-related mutations of TARDBP (TDP-43) cause motor deficits in vivo.* Hum Mol Genet, 2010. **19**(4): p. 671-83.
89. Johnson, B.S., et al., *A yeast TDP-43 proteinopathy model: Exploring the molecular determinants of TDP-43 aggregation and cellular toxicity.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(17): p. 6439-44.
90. Kraemer, B.C., et al., *Loss of murine TDP-43 disrupts motor function and plays an essential role in embryogenesis.* Acta Neuropathol, 2010. **119**(4): p. 409-19.
91. Tatom, J.B., et al., *Mimicking aspects of frontotemporal lobar degeneration and Lou Gehrig's disease in rats via TDP-43 overexpression.* Mol Ther, 2009. **17**(4): p. 607-13.
92. Wang, D.B., et al., *Expansive gene transfer in the rat CNS rapidly produces amyotrophic lateral sclerosis relevant sequelae when TDP-43 is overexpressed.* Mol Ther, 2010. **18**(12): p. 2064-74.
93. Shan, X., et al., *Altered distributions of Gemini of coiled bodies and mitochondria in motor neurons of TDP-43 transgenic mice.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(37): p. 16325-30.
94. Stallings, N.R., et al., *Progressive motor weakness in transgenic mice expressing human TDP-43.* Neurobiol Dis, 2010. **40**(2): p. 404-14.
95. Tsai, K.J., et al., *Elevated expression of TDP-43 in the forebrain of mice is sufficient to cause neurological and pathological phenotypes mimicking FTLD-U.* J Exp Med, 2010. **207**(8): p. 1661-73.
96. Arnold, E.S., et al., *ALS-linked TDP-43 mutations produce aberrant RNA splicing and adult-onset motor neuron disease without aggregation or loss of nuclear TDP-43.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(8): p. E736-45.
97. Walker, A.K., et al., *Functional recovery in new mouse models of ALS/FTLD after clearance of pathological cytoplasmic TDP-43.* Acta Neuropathol, 2015. **130**(5): p. 643-60.
98. Chew, J., et al., *Neurodegeneration. C9ORF72 repeat expansions in mice cause TDP-43 pathology, neuronal loss, and behavioral deficits.* Science, 2015. **348**(6239): p. 1151-4.
99. Amlie-Wolf, A., et al., *Transcriptomic Changes Due to Cytoplasmic TDP-43 Expression Reveal Dysregulation of Histone Transcripts and Nuclear Chromatin.* PLoS One, 2015. **10**(10): p. e0141836.
100. Davis, H.P. and L.R. Squire, *Protein synthesis and memory: a review.* Psychol Bull, 1984. **96**(3): p. 518-59.

101. Kandel, E.R., *The molecular biology of memory storage: a dialogue betweengenes and synapses*. Science. Vol. 294. 2001. 1030–1038.

102. Lanahan, A. and P. Worley, *Immediate-early genes and synaptic function.* Neurobiol Learn Mem, 1998. **70**(1-2): p. 37-43.
103. Okuno, H., *Regulation and function of immediate-early genes in the brain: beyond neuronal activity markers.* Neurosci Res, 2011. **69**(3): p. 175-86.
104. Curran, T. and J.I. Morgan, *Memories of fos.* Bioessays, 1987. **7**(6): p. 255-8.
105. Guzowski, J.F., *Insights into immediate-early gene function in hippocampal memory consolidation using antisense oligonucleotide and fluorescent imaging approaches.* Hippocampus, 2002. **12**(1): p. 86-104.
106. Greenberg, M.E. and E.B. Ziff, *Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene.* Nature, 1984. **311**(5985): p. 433-8.
107. Kubik, S., T. Miyashita, and J.F. Guzowski, *Using immediate-early genes to map hippocampal subregional functions.* Learn Mem, 2007. **14**(11): p. 758-70.
108. Izquierdo, I. and J.H. Medina, *Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures.* Neurobiol Learn Mem, 1997. **68**(3): p. 285-316.
109. Tischmeyer, W. and R. Grimm, *Activation of immediate early genes and memory formation.* Cell Mol Life Sci, 1999. **55**(4): p. 564-74.
110. He, J., K. Yamada, and T. Nabeshima, *A role of Fos expression in the CA3 region of the hippocampus in spatial memory formation in rats.* Neuropsychopharmacology, 2002. **26**(2): p. 259-68.
111. Lamprecht, R. and Y. Dudai, *Transient expression of c-Fos in rat amygdala during training is required for encoding conditioned taste aversion memory.* Learn Mem, 1996. **3**(1): p. 31-41.
112. Frankland, P.W., et al., *The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory.* Science, 2004. **304**(5672): p. 881-3.
113. Frankland, P.W., et al., *Alpha-CaMKII-dependent plasticity in the cortex is required for permanent memory.* Nature, 2001. **411**(6835): p. 309-13.
114. Maviel, T., et al., *Sites of neocortical reorganization critical for remote spatial memory.* Science, 2004. **305**(5680): p. 96-9.
115. Worley, P.F., et al., *Thresholds for synaptic activation of transcription factors in hippocampus: correlation with long-term enhancement.* J Neurosci, 1993. **13**(11): p. 4776-86.
116. Radwanska, A., et al., *Involvement of retrosplenial cortex in classical conditioning.* Behav Brain Res, 2010. **214**(2): p. 231-9.
117. Pothuizen, H.H., et al., *Granular and dysgranular retrosplenial cortices provide qualitatively different contributions to spatial working memory: evidence from immediate-early gene imaging in rats.* Eur J Neurosci, 2009. **30**(5): p. 877-88.
118. Guzowski, J.F., et al., *Environment-specific expression of the immediate-early gene Arc in hippocampal neuronal ensembles.* Nat Neurosci, 1999. **2**(12): p. 1120-4.
119. Vazdarjanova, A., et al., *Experience-dependent coincident expression of the effector immediate-early genes arc and Homer 1a in hippocampal and neocortical neuronal networks.* J Neurosci, 2002. **22**(23): p. 10067-71.
120. Ramirez-Amaya, V., et al., *Spatial exploration-induced Arc mRNA and protein expression: evidence for selective, network-specific reactivation.* J Neurosci, 2005. **25**(7): p. 1761-8.
121. Moga, D.E., et al., *Activity-regulated cytoskeletal-associated protein is localized to recently activated excitatory synapses.* Neuroscience, 2004. **125**(1): p. 7-11.
122. Plath, N., et al., *Arc/Arg3.1 is essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories.* Neuron, 2006. **52**(3): p. 437-44.
123. Rial Verde, E.M., et al., *Increased expression of the immediate-early gene arc/arg3.1 reduces AMPA receptor-mediated synaptic transmission.* Neuron, 2006. **52**(3): p. 461-74.
124. Chowdhury, S., et al., *Arc/Arg3.1 interacts with the endocytic machinery to regulate AMPA receptor trafficking.* Neuron, 2006. **52**(3): p. 445-59.
125. Gusev, P.A. and A.N. Gubin, *Arc/Arg3.1 mRNA global expression patterns elicited by memory recall in cerebral cortex differ for remote versus recent spatial memories.* Front Integr Neurosci, 2010. **4**: p. 15.

126. Mamiya, N., et al., *Brain region-specific gene expression activation required for reconsolidation and extinction of contextual fear memory.* J Neurosci, 2009. **29**(2): p. 402-13.
127. Desgranges, B., et al., *Flavor preference learning increases olfactory and gustatory convergence onto single neurons in the basolateral amygdala but not in the insular cortex in rats.* PLoS One, 2010. **5**(4): p. e10097.
128. Carpenter-Hyland, E.P., et al., *Arc expression and neuroplasticity in primary auditory cortex during initial learning are inversely related to neural activity.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(33): p. 14828-32.
129. Wang, I.F., et al., *TDP-43, the signature protein of FTLD-U, is a neuronal activity-responsive factor.* J Neurochem, 2008. **105**(3): p. 797-806.
130. Sutton, M.A. and E.M. Schuman, *Dendritic protein synthesis, synaptic plasticity, and memory.* Cell, 2006. **127**(1): p. 49-58.
131. Mayford, M., et al., *Control of memory formation through regulated expression of a CaMKII transgene.* Science, 1996. **274**(5293): p. 1678-83.
132. Gossen, M. and H. Bujard, *Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(12): p. 5547-51.
133. Crawley, J.N., *Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice: experimental design and evaluation of general health, sensory functions, motor abilities, and specific behavioral tests.* Brain Res, 1999. **835**(1): p. 18-26.
134. Bevins, R.A. and J. Besheer, *Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'.* Nat Protoc, 2006. **1**(3): p. 1306-11.
135. Boccia, M.M., et al., *Memory consolidation and reconsolidation of an inhibitory avoidance response in mice: effects of i.c.v. injections of hemicholinium-3.* Neuroscience, 2004. **124**(4): p. 735-41.
136. Belforte, J.E., et al., *Postnatal NMDA receptor ablation in corticolimbic interneurons confers schizophrenia-like phenotypes.* Nat Neurosci, 2010. **13**(1): p. 76-83.
137. Brodkin, E.S., et al., *Social approach-avoidance behavior of inbred mouse strains towards DBA/2 mice.* Brain Res, 2004. **1002**(1-2): p. 151-7.
138. Depino, A.M., L. Lucchina, and F. Pitossi, *Early and adult hippocampal TGF-beta1 overexpression have opposite effects on behavior.* Brain Behav Immun, 2011. **25**(8): p. 1582-91.
139. Salinger, W.L., P. Ladrow, and C. Wheeler, *Behavioral phenotype of the reeler mutant mouse: effects of RELN gene dosage and social isolation.* Behav Neurosci, 2003. **117**(6): p. 1257-75.
140. Metz, G.A. and M.E. Schwab, *Behavioral characterization in a comprehensive mouse test battery reveals motor and sensory impairments in growth-associated protein-43 null mutant mice.* Neuroscience, 2004. **129**(3): p. 563-74.
141. Crawley, J.N., *Mouse behavioral assays relevant to the symptoms of autism.* Brain Pathol, 2007. **17**(4): p. 448-59.
142. Franklin, G.P.a.K., *Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates 4th Edition*. 2012: Academic Press.
143. Tsao, W., et al., *Rodent models of TDP-43: recent advances.* Brain Res, 2012. **1462**: p. 26-39.
144. Chou, A.H., et al., *Polyglutamine-expanded ataxin-3 causes cerebellar dysfunction of SCA3 transgenic mice by inducing transcriptional dysregulation.* Neurobiol Dis, 2008. **31**(1): p. 89-101.
145. Miguel, L., et al., *Both cytoplasmic and nuclear accumulations of the protein are neurotoxic in Drosophila models of TDP-43 proteinopathies.* Neurobiol Dis, 2011. **41**(2): p. 398-406.
146. Dayton, R.D., et al., *Selective forelimb impairment in rats expressing a pathological TDP-43 25 kDa C-terminal fragment to mimic amyotrophic lateral sclerosis.* Mol Ther, 2013. **21**(7): p. 1324-34.
147. Ennaceur, A., *One-trial object recognition in rats and mice: methodological and theoretical issues.* Behav Brain Res, 2010. **215**(2): p. 244-54.
148. Warburton, E.C. and M.W. Brown, *Findings from animals concerning when interactions between perirhinal cortex, hippocampus and medial prefrontal cortex are necessary for recognition memory.* Neuropsychologia, 2010. **48**(8): p. 2262-72.

149. Shinagawa, S., et al., *Initial symptoms in frontotemporal dementia and semantic dementia compared with Alzheimer's disease.* Dement Geriatr Cogn Disord, 2006. **21**(2): p. 74-80.
150. Moy, S.S., et al., *Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: an approach to assess autistic-like behavior in mice.* Genes Brain Behav, 2004. **3**(5): p. 287-302.
151. Seeley, W.W., *Selective functional, regional, and neuronal vulnerability in frontotemporal dementia.* Curr Opin Neurol, 2008. **21**(6): p. 701-7.
152. Robertson, C.L., et al., *Physiologic progesterone reduces mitochondrial dysfunction and hippocampal cell loss after traumatic brain injury in female rats.* Exp Neurol, 2006. **197**(1): p. 235-43.
153. Aviles-Reyes, R.X., et al., *Intermittent hypoxia during sleep induces reactive gliosis and limited neuronal death in rats: implications for sleep apnea.* J Neurochem, 2010. **112**(4): p. 854-69.
154. Christensen, D.Z., M.S. Thomsen, and J.D. Mikkelsen, *Reduced basal and novelty-induced levels of activity-regulated cytoskeleton associated protein (Arc) and c-Fos mRNA in the cerebral cortex and hippocampus of APPswe/PS1DeltaE9 transgenic mice.* Neurochem Int, 2013. **63**(1): p. 54-60.
155. Huckleberry, K.A., et al., *Behavioral experience induces zif268 expression in mature granule cells but suppresses its expression in immature granule cells.* Front Syst Neurosci, 2015. **9**: p. 118.
156. Zhou, H., et al., *Transgenic rat model of neurodegeneration caused by mutation in the TDP gene.* PLoS Genet, 2010. **6**(3): p. e1000887.
157. Swarup, V., et al., *Pathological hallmarks of amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal lobar degeneration in transgenic mice produced with TDP-43 genomic fragments.* Brain, 2011. **134**(Pt 9): p. 2610-26.
158. Caccamo, A., S. Majumder, and S. Oddo, *Cognitive decline typical of frontotemporal lobar degeneration in transgenic mice expressing the 25-kDa C-terminal fragment of TDP-43.* Am J Pathol, 2012. **180**(1): p. 293-302.
159. Uchida, A., et al., *Non-human primate model of amyotrophic lateral sclerosis with cytoplasmic mislocalization of TDP-43.* Brain, 2012. **135**(Pt 3): p. 833-46.
160. Ramaswami, M., J.P. Taylor, and R. Parker, *Altered ribostasis: RNA-protein granules in degenerative disorders.* Cell, 2013. **154**(4): p. 727-36.
161. Donnelly, C.J., J.C. Grima, and R. Sattler, *Aberrant RNA homeostasis in amyotrophic lateral sclerosis: potential for new therapeutic targets?* Neurodegener Dis Manag, 2014. **4**(6): p. 417-37.
162. Alami, N.H., et al., *Axonal transport of TDP-43 mRNA granules is impaired by ALS-causing mutations.* Neuron, 2014. **81**(3): p. 536-43.
163. Roberson, E.D., *Mouse models of frontotemporal dementia.* Ann Neurol, 2012. **72**(6): p. 837-49.
164. Liu, Y.C., P.M. Chiang, and K.J. Tsai, *Disease animal models of TDP-43 proteinopathy and their pre-clinical applications.* Int J Mol Sci, 2013. **14**(10): p. 20079-111.
165. Philips, T. and J.D. Rothstein, *Rodent Models of Amyotrophic Lateral Sclerosis.* Curr Protoc Pharmacol, 2015. **69**: p. 5 67 1-21.
166. Rodriguez-Ortiz, C.J., et al., *Neuronal-specific overexpression of a mutant valosin-containing protein associated with IBMPFD promotes aberrant ubiquitin and TDP-43 accumulation and cognitive dysfunction in transgenic mice.* Am J Pathol, 2013. **183**(2): p. 504-15.
167. Yin, F., et al., *Behavioral deficits and progressive neuropathology in progranulin-deficient mice: a mouse model of frontotemporal dementia.* FASEB J, 2010. **24**(12): p. 4639-47.
168. Ghoshal, N., et al., *Core features of frontotemporal dementia recapitulated in progranulin knockout mice.* Neurobiol Dis, 2012. **45**(1): p. 395-408.
169. Filiano, A.J., et al., *Dissociation of frontotemporal dementia-related deficits and neuroinflammation in progranulin haploinsufficient mice.* J Neurosci, 2013. **33**(12): p. 5352-61.
170. Vernay, A., et al., *A transgenic mouse expressing CHMP2Bintron5 mutant in neurons develops histological and behavioural features of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia.* Hum Mol Genet, 2016.
171. Koss, D.J., et al., *Mutant Tau knock-in mice display frontotemporal dementia relevant behaviour and histopathology.* Neurobiol Dis, 2016. **91**: p. 105-23.

172. Dayton, R.D., et al., *Frontotemporal lobar degeneration-related proteins induce only subtle memory-related deficits when bilaterally overexpressed in the dorsal hippocampus.* Exp Neurol, 2012. **233**(2): p. 807-14.
173. Alfieri, J.A., P.R. Silva, and L.M. Igaz, *Early Cognitive/Social Deficits and Late Motor Phenotype in Conditional Wild-Type TDP-43 Transgenic Mice.* Front Aging Neurosci, 2016. **8**: p. 310.
174. Mendez, M.F., J.S. Shapira, and B.L. Miller, *Stereotypical movements and frontotemporal dementia.* Mov Disord, 2005. **20**(6): p. 742-5.
175. Halabi, C., et al., *Patterns of striatal degeneration in frontotemporal dementia.* Alzheimer Dis Assoc Disord, 2013. **27**(1): p. 74-83.
176. Baez-Mendoza, R. and W. Schultz, *The role of the striatum in social behavior.* Front Neurosci, 2013. **7**: p. 233.
177. Nieh, E.H., et al., *Optogenetic dissection of neural circuits underlying emotional valence and motivated behaviors.* Brain Res, 2013. **1511**: p. 73-92.
178. Hoefer, M., et al., *Fear conditioning in frontotemporal lobar degeneration and Alzheimer's disease.* Brain, 2008. **131**(Pt 6): p. 1646-57.
179. Cammarota, M., et al., *Parallel memory processing by the CA1 region of the dorsal hippocampus and the basolateral amygdala.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(30): p. 10279-84.
180. Buratti, E., et al., *Nuclear factor TDP-43 can affect selected microRNA levels.* FEBS J, 2010. **277**(10): p. 2268-81.
181. Kawahara, Y. and A. Mieda-Sato, *TDP-43 promotes microRNA biogenesis as a component of the Drosha and Dicer complexes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(9): p. 3347-52.
182. Zhang, Z., et al., *Downregulation of microRNA-9 in iPSC-derived neurons of FTD/ALS patients with TDP-43 mutations.* PLoS One, 2013. **8**(10): p. e76055.
183. Iguchi, Y., et al., *TDP-43 depletion induces neuronal cell damage through dysregulation of Rho family GTPases.* J Biol Chem, 2009. **284**(33): p. 22059-66.
184. Majumder, P., et al., *TDP-43 regulates the mammalian spinogenesis through translational repression of Rac1.* Acta Neuropathol, 2012. **124**(2): p. 231-45.
185. West, A.E. and M.E. Greenberg, *Neuronal activity-regulated gene transcription in synapse development and cognitive function.* Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(6).
186. Purcell, S.M., et al., *A polygenic burden of rare disruptive mutations in schizophrenia.* Nature, 2014. **506**(7487): p. 185-90.
187. Minatohara, K., M. Akiyoshi, and H. Okuno, *Role of Immediate-Early Genes in Synaptic Plasticity and Neuronal Ensembles Underlying the Memory Trace.* Front Mol Neurosci, 2015. **8**: p. 78.
188. van der Staay, F.J., S.S. Arndt, and R.E. Nordquist, *Evaluation of animal models of neurobehavioral disorders.* Behav Brain Funct, 2009. **5**: p. 11.
189. Malkesman, O., et al., *Reverse translational strategies for developing animal models of bipolar disorder.* Dis Model Mech, 2009. **2**(5-6): p. 238-45.
190. Epstein, D.H., et al., *Toward a model of drug relapse: an assessment of the validity of the reinstatement procedure.* Psychopharmacology (Berl), 2006. **189**(1): p. 1-16.