

TESIS DOCTORAL

Generación de nuevos modelos y búsqueda de modificadores para el Síndrome de Dravet en *Drosophila melanogaster*

Andrea Tapia González

Programa de doctorado en Biotecnología

Director: Máximo Ibo Galindo Orozco

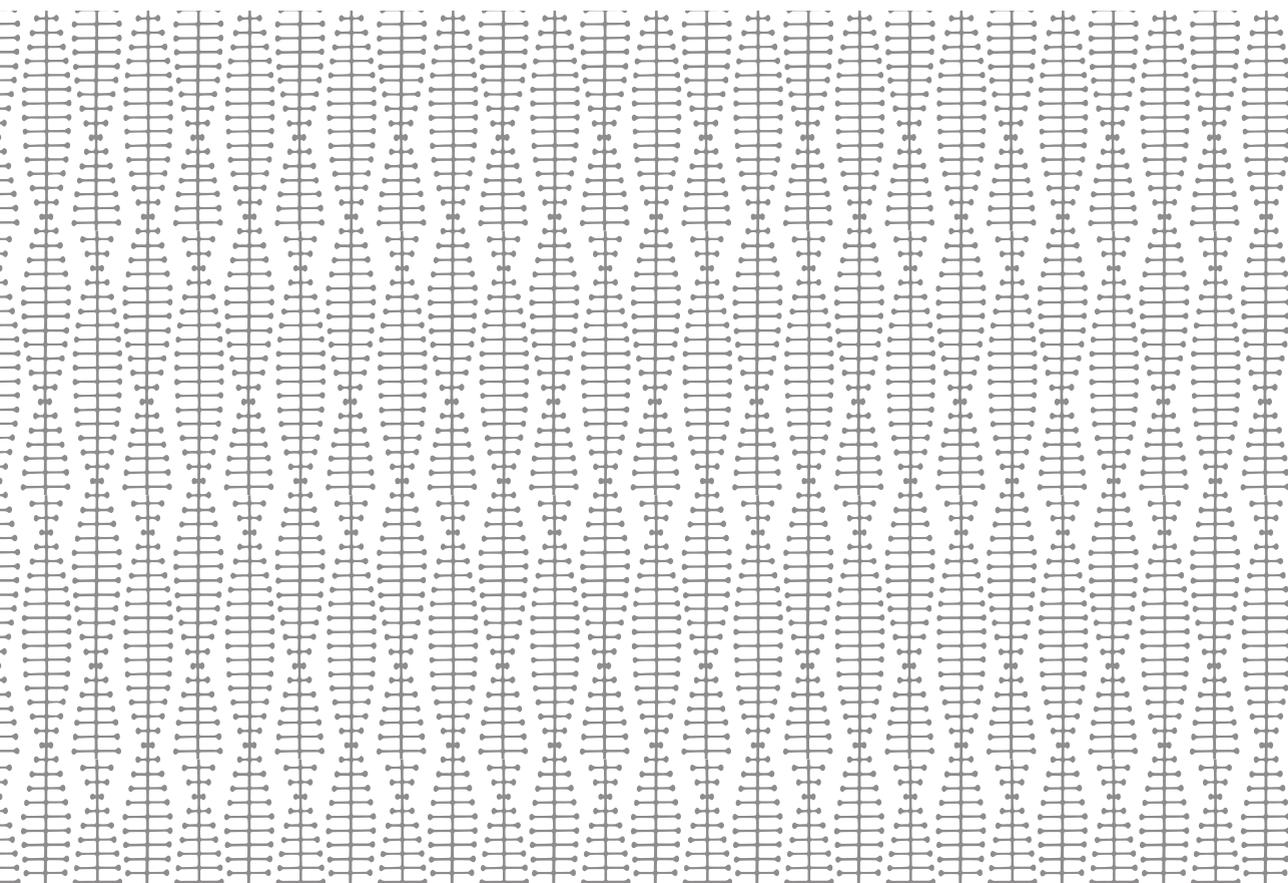
Valencia, Abril de 2022



PRINCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Máximo Ibo Galindo Orozco, Dr en Biología por la Universidad de Valencia hace constar que el trabajo de investigación titulado “Generación de nuevos modelos y búsqueda de modificadores para el síndrome de Dravet en *Drosophila melanogaster*” elaborado por la doctoranda Andrea Tapia González, en el Centro de Investigación Príncipe Felipe, para la obtención del Doctorado en Biotecnología por la Universidad Politécnica de Valencia, ha sido realizado bajo su tutorización y reúne las condiciones para ser defendido por su autora.

Valencia, 24 de marzo, 2022

Dr. Máximo Ibo Galindo Orozco

"A veces la ciencia es más un arte que una ciencia"

Rick Sánchez

Agradecimientos

He escrito estos agradecimientos con especial ilusión y entusiasmo y espero haber reflejado lo más verazmente posible el apoyo y acompañamiento que he vivido y sentido a lo largo de todos estos años.

Ibo has sido mi tutor y mentor desde que empecé en el mundo de la investigación y contigo he aprendido mucho, no solo sobre biología ni *Drosophila melanogaster*. Sinceramente a veces he tenido celos de tu inteligencia, pero nunca has dudado en compartirla y explicarme todo las veces que hiciera falta. Siempre he sentido tu confianza, respeto y comprensión, lo cual hace una tesis incluso amena a ratos.

Víctor, amb aquest i la resta d'agraïments que t'he dedicat continue tenint la sensació de quedar-me curta. M'has ensenyat tot i més, a treballar en el laboratori i amb les persones, gràcies per tanta empatia.

Gracias a todo el equipo de **Apoyodravet** y en especial a **Luismi** por el esfuerzo sobrehumano que haces día tras día y por creer en la investigación. Lo has puesto fácil, nos has motivado y hemos sentido que éramos parte de algo importante.

A toda la gente con la que he compartido laboratorio del CIPF y la universidad de Manchester por amenizar el trabajo física y psicológicamente hablando. Gracias a **Carlo, Richard y Carol** por tanta simpatía y profesionalidad, me hicisteis creer que era realmente válida. Gracias a todos los estudiantes, en especial a **Andrés**, por el buen rollo y la amistad que nos ha unido fuera del laboratorio, este trabajo también tiene un algo de ti. También me gustaría mencionar a **Mari Carmen**, por ser tan buena en todos los sentidos.

Al "*dream team*" del centro por hacerme sentir parte de algo tan genial. Gracias **José Miguel** por ser tan bonachón y compartir tu sabiduría e humor inteligente con el resto. Gracias **Fátima** por tu naturalidad y los planes infinitos, no sabes cuánto te echamos de menos. Gracias **Arantxa** por ser más maja que las pesetas y tu racionalidad salvadora, contigo todos nos sentimos más tranquilos y unidos. Gracias **María José**

por la complicidad y el cariño, no sabes cuánto me aporta tenerte cerca. Gracias **Candela** por nuestra amistad casi romántica, por perdernos en coche más de lo que deberíamos, pero acabar riéndonos como siempre de nuestras desgracias. Gracias **Jesús** por no dejar que me aburra nunca haciéndome la puñeta. Gracias **Espe** por apuntarte a un bombardeo y dar buenos consejos.

Gracias **Sandra** por ser tan mala y buena a la vez, por adoptarnos siempre en Buñol y cuidar tanto de Candela y de mí. Gràcies **Mar** per creure en mi i estimar-me tan bé.

Gracias a los y las de siempre, a **Aroa** por ser el pilar maestro de mi vida y a toda mi familia. En especial a mis **padres y hermana**, esteu en tot el que soc i aconseguisc i jo també em senc molt orgullosa d això.

Generación de nuevos modelos y búsqueda de modificadores para el síndrome de Dravet en *Drosophila melanogaster*

Autora: Andrea Tapia González

Tutor: Máximo Ibo Galindo Orozco

Valencia, abril de 2022

RESUMEN

El síndrome de Dravet es una epilepsia severa rara causada por mutaciones en el gen *SCN1A*, el cual codifica para la proteína Nav1.1, subunidad α de los canales de sodio regulados por voltaje. En esta tesis se ha generado mediante recombinación homóloga, una nueva mutación en el gen *para* que hemos denominado *para*^{KO}, el cual cumple la misma función en *Drosophila melanogaster*. Estas moscas han mostrado un fenotipo epiléptico inducido por altas temperaturas, y muerte súbita en el caso de las crisis de larga duración. También se han observado alteraciones musculares en ensayos de geotaxis negativa, vuelo y locomoción. Del mismo modo, han presentado problemas cognitivos como la ansiedad y dificultades en el aprendizaje. El uso de imanes como terapia contra el fenotipo epiléptico ha tenido buenos resultados retrasando la aparición de las crisis y disminuyendo su duración y la cantidad de moscas que las padecen.

El perfil metabólico de las cabezas de estas moscas mostró un incremento en la concentración de aminoácidos, succinato y lactato, alteraciones que se pueden relacionar con la epilepsia y la disfunción mitocondrial. El neurotransmisor GABA, principal implicado en el síndrome de Dravet, mostró niveles superiores en el modelo generado. El análisis electrofisiológico de las corrientes de sodio de las motoneuronas aCC en estadio de larva señaló aumentos en las corrientes persistentes de sodio y su

ratio con las transitorias, lo cual podría justificar las crisis epilépticas. Además, la excitabilidad y el tamaño de estas células fueron menores. Todos estos cambios presentes en los mutantes KO generados hacen de estas moscas un buen modelo para estudio de la epilepsia en general, y del síndrome de Dravet en particular. Este modelo ofrece nuevas herramientas para entender la patofisiología de la enfermedad y la búsqueda de biomarcadores y tratamientos.

Finalmente la búsqueda de modificadores genéticos a través de ensayos de supervivencia, tiempo de recuperación a crisis y vuelo empleando el modelo *para*^{bss1} obtuvo buenos resultados con los genes *nAchRa4* y *KCNQ*. El gen *toy* por el contrario resultó ser intensificador. La variabilidad en los resultados obtenidos en este apartado cuestiona la manera de llevar a cabo este tipo de estudios en modelos animales y pacientes del síndrome de Dravet.

Palabras clave: síndrome de Dravet, epilepsia, electrofisiología, modificadores, canales de sodio, metabólica.

Generació de nous models i recerca de modificadors per a la síndrome de Dravet amb *Drosophila melanogaster*

Autora: Andrea Tapia González

Tutor: Máximo Ibo Galindo Orozco

València, abril de 2022

RESUM

La síndrome de Dravet és una epilèpsia severa rara causada per mutacions en el gen *SCN1A*, el qual codifica per la proteïna Nav1.1, subunitat α dels canals de sodi regulats per voltatge. En aquesta tesi s'ha generat, mitjançant recombinació homòloga, una nova mutació en el gen *para*, anomenada *para*^{KO}, el qual té la mateixa funció en *Drosophila melanogaster*. Aquestes mosques han mostrat un fenotip epilèptic induït per altes temperatures, y mort súbdita en el cas de les crisis de llarga duració. També s'han observat alteracions musculars en assajos de geotaxis negativa, vol y locomoció. De la mateixa manera, han presentat problemes cognitius como l'ansietat i dificultats en l'aprenentatge. L'ús d'imants com teràpia contra el fenotip epilèptic ha tingut bons resultats endarrerint l'aparició de les crisis i disminuint la seua durada i la quantitat de mosques que les pateixen.

El perfil metabolòmic dels caps d'aquestes mosques mostrà increments en la concentració d'aminoàcids, succinat i lactat, alteracions les quals es poden relacionar amb l'epilèpsia y la disfunció mitocondrial. El neurotransmissor GABA, principal implicat en la síndrome de Dravet, mostrà nivells superiors en el model generat. L'anàlisi electrofisiològic de les corrents de sodi de les motoneurons aCC en estadi de larva assenyala augmentos en les corrents persistents de sodi y el seu ràtio amb les transitòries, lo qual podria justificar les crisis epilèptiques. A més a més, l'excitabilitat y

el tamany d'aquestes cèl·lules va ser menor. Todos aquests canvis presents en els mutants KO generats fan d'aquestes mosques un model per a l'estudi de l'epilèpsia en general, i de la síndrome de Dravet en particular. Aquest model ofereix noves ferramentes per a entendre la patofisiologia de la malaltia i la recerca de biomarcadors y tractaments.

Finalment la recerca de modificadors genètics a través d'assajos de supervivència, temps de recuperació a crisis y vol mitjançant el model *para*^{bss1} va obtenir bons resultats amb els gens *nAchRa4* y *KCNQ*. El gen *toy* pel contrari resultà ser intensificador. La variabilitat en els resultats obtinguts en aquest apartat qüestiona la manera de fer aquest tipus d'estudis en models animals i pacients de la síndrome de Dravet.

Paraules clau: síndrome de Dravet, epilèpsia, electrofisiologia, modificadors, canals de sodi, metabolòmica

New models generation and modifiers search for Dravet syndrome in *Drosophila melanogaster*

Author: Andrea Tapia González

Tutor: Máximo Ibo Galindo Orozco

Valencia, April 2022

ABSTRACT

Dravet syndrome is a severe rare epileptic disease caused by mutations in the *SCN1A* gene coding for the Nav1.1 protein, a voltage-gated sodium channel alpha subunit. In this thesis we have made a new mutation in a gene called *para*^{KO} through homologous recombination, the single *Drosophila melanogaster* gene encoding this type of protein. These flies showed a heat-induced seizing phenotype, and sudden death in long term seizures. In addition to seizures, neuromuscular alterations were observed in climbing, flight and locomotion tests. Moreover, they also manifested some cognitive alterations such as anxiety and difficulties in learning. Using magnets as a therapy for epileptic phenotype, seizures start was delayed, and its duration and the quantity of flies affected was lower.

Metabolomic profile of these flies' brains showed an increase in the amount of aminoacids, succinate and lactate, alterations that could be related with epilepsy and mitochondrial dysfunction. GABA, the main neurotransmitter involved in Dravet syndrome, was higher in the *para*^{KO} model. Electrophysiological sodium current analysis from aCC motoneurons in larvae stage revealed an increase in persistent currents and their ratio with transients, which is a symptom for epileptic seizures. Cell size and excitability were lower in these cells too. All these changes in the paralytic knock-out flies indicate that this is a good model for epilepsy and specifically for Dravet

syndrome. This model could be a new tool to understand the pathophysiology of the disease and to find biomarkers, genetic modifiers and new treatments.

Finally, a search for genetic modifiers through survival, recuperation time and flight using *para*^{bss1} flies obtained good results with *nAchRa4* y *KCNQ*. Otherwise, *toy* gene was an enhancer. However, variability observed in these type of assays dispute how modifiers search is made with model animals and Dravet syndrome patients.

Kew words: Dravet syndrome, epilepsy, electrophysiology, modifiers, sodium channels, metabolomics.

ÍNDICE

Introducción	1
Los canales de sodio	1
Origen y clasificación	3
Epilepsia y canalopatías	5
<i>SCN1A</i> y el síndrome de Dravet	5
Modelos animales e investigación en el síndrome de Dravet	7
Sistemas de expresión heteróloga	10
iPSC	11
Pez cebra.....	11
<i>Drosophila melanogaster</i>	12
Objetivos	16
Capítulo I. Generación de un mutante KO del gen <i>para</i> en <i>Drosophila melanogaster</i> por la técnica de la recombinación homóloga. Validación y caracterización como modelo del síndrome de Dravet	
Introducción	17
La recombinación homóloga.....	17
Resultados	21
Diseño y proporciones de la recombinación homóloga.....	21
Validación KO	22
Crisis y temperatura	24
Estatus epiléptico.....	26
Geotaxis negativa	27
Vuelo.....	28
Locomoción en la arena	29
Aprendizaje y memoria a corto plazo	30
Tratamiento de las crisis con imanes.....	32
Supervivencia en ayuno	33
Metabolómica.....	34

Generación modelo "knock-in"	40
Discusión.....	41
Capítulo II. Análisis funcional de los canales de sodio en el mutante <i>para</i>^{KO}	
Introducción.....	44
Electrofisiología de las neuronas	44
La electrofisiología en <i>Drosophila melanogaster</i>	46
Resultados.....	49
Electroshock	49
Capacitancia	50
Corrientes de Na	51
Excitabilidad de la membrana	54
Análisis de las uniones neuromusculares.....	57
Discusión	58
Capítulo III. Búsqueda de genes modificadores para el síndrome de Dravet empleando el modelo <i>para</i>^{bss1}	
Introducción.....	61
El papel de los modificadores genéticos en las enfermedades mendelianas y raras	61
<i>D.Melanogaster</i> como herramienta para la búsqueda de modificadores.....	62
Modificadores genéticos en síndrome de Dravet	62
Modelo <i>para</i> ^{bss1}	63
Resultados.....	66
Preselección y aproximación en la búsqueda de genes modificadores	66
Análisis de los genes candidatos.....	68
Tratamientos	80
Discusión	82
Discusión general	85
Conclusiones	87
Material y métodos.....	89

Biología molecular	89
Diseño del plásmido	89
Clonaciones	89
Extracción de ADN	91
Extracción de ARN, RT-PCR y PCRc.....	91
Cuantificación del material genético.....	93
Trabajo con <i>Drosophila melanogaster</i>	93
Cepas de moscas, mantenimiento y generación de transgénicos	93
Genotipos experimentales	94
Recolección de embriones para analizar la expresión génica	96
Recolección de embriones para determinar la fase letal	97
Supervivencia.....	97
Geotaxis negativa	97
Ensayo de locomoción.....	98
Ensayo de vuelo	100
Aprendizaje y memoria	101
Crisis mecánicas.....	102
Crisis térmicas.....	103
Estatus epiléptico.....	103
Imán.....	103
Ensayos de electrofisiología	104
Electroshock	104
Pinzas de voltaje y de corriente (" <i>patch and voltage clamp</i> ")	105
Disoluciones.....	105
Uniones neuromusculares	106
Estadística e ilustración.....	106
Bibliografía	107
Anexos	129

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura visual de los canales de sodio.....	2
Figura 2. Representación gráfica de los órganos de <i>Drosophila melanogaster</i>	13
Figura 3. Esquema del vector pTV cherry.....	18
Figura 4. Cruces necesarios para la obtención del candidato a KO.....	20
Figura 5. Validación genómica del KO.....	22
Figura 6. Validación de la disminución de expresión del gen <i>para</i>	23
Figura 7. Crisis y su evolución con el tiempo.....	25
Figura 8. Muerte debida al estatus epiléptico.	26
Figura 9. Porcentaje de geotaxis negativa.	28
Figura 10. Distancia de estabilización durante el vuelo.....	29
Figura 11. Locomoción.....	30
Figura 12. Aprendizaje y memoria a corto plazo.....	31
Figura 13. Cantidad, duración y aparición de las crisis tras el uso de imanes..	32
Figura 14. Supervivencia al ayuno.....	33
Figura 15. PCA de los espectros de RMN provenientes de los extractos de la fase acuosa de cabezas.....	34
Figura 16. Diferencias metabólicas de aminoácidos.	36
Figura 17. Diferencias metabólicas de lactato y succinato..	37
Figura 18. Diferencias metabólicas de GABA..	37
Figura 19. PCA de los espectros de RMN provenientes de los extractos de la fase orgánica de cabezas.	38
Figura 20. Diferencias metabólicas en los metabolitos de la fase orgánica.	39
Figura 21. Corrientes de sodio y conformación del canal en situaciones de homeostasis y desequilibrio.....	45
Figura 22. Procedimiento de electrofisiología.	48
Figura 23. Tiempo de recuperación tras un electroshock.	49
Figura 24. Capacitancia.	50

Figura 25. Medida de las corrientes de Na con el protocolo de un paso.....	51
Figura 26. Na _T aisladas.....	52
Figura 27. Na _P aisladas.....	53
Figura 28. Excitabilidad de la membrana.....	54
Figura 29. Excitabilidad en función del potencial.....	56
Figura 30. Resistencia NMJ.....	57
Figura 31. Esquema representativo de las crisis en el modelo <i>para^{bss1}</i> de <i>Drosophila melanogaster</i>	64
Figura 32. Esquema del funcionamiento del sistema UAS-Gal4.....	67
Figura 33. Resultados <i>cac^{ARNi}</i>	69
Figura 34. Resultados <i>nAChRa4^{ARNi}</i>	71
Figura 35. Resultados <i>nAChRa1^{ARNi}</i>	73
Figura 36. Resultados <i>Clc-α^{ARNi}</i>	75
Figura 37. Resultados <i>KCNQ^{ARNi}</i>	77
Figura 38. Resultados <i>toy^{ARNi}</i>	79
Figura 39. Efecto del harmol en la supervivencia del genotipo <i>para^{bss1}</i>	80
Figura 40. Tiempo de recuperación a crisis del genotipo <i>para^{bss1}</i> con bórax.....	81
Figura 41. Esquema de los cruces para el cartografiado de la inserción.....	95
Figura 42. Montaje para hacer el ensayo del climbing.....	98
Figura 43. Imagen de la estructura empleada para el ensayo de locomoción.....	99
Figura 44. Instrumentación ensayo de vuelo.....	100
Figura 45. Equipo empleado para el ensayo de aprendizaje y memoria.....	101
Figura 46. Imágenes de la realización de los experimentos del imán.....	104

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Isoformas, genes, homologías, tejidos de expresión y patologías asociadas de los canales de sodio humanos.....	4
Tabla 2. Genotipo y fenotipo de los principales modelos de ratón de síndrome de Dravet	10
Tabla 3. Genes de estudio candidatos a modificadores.. ..	66
Tabla 4. Resumen de los resultados obtenidos de cada genotipo modificador en los diferentes ensayos llevados a cabo.....	82
Tabla 5. Cebadores empleados durante el trabajo	130
Tabla 6. Cepas empleadas durante la elaboración de este trabajo.....	132

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Aa: aminoácidos

Ach: acetilcolina

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

ARNdc: ácido ribonucleico de doble cadena

ARNi: ácido ribonucleico interferente

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

BDSC: centro de stock de *Drosophila melanogaster* en Bloomington

BS: sensible a “bang”

C. elegans: *Caenorhabditis elegans*

Cac: “cacophony”

CACNA1A: subunidad $\alpha 1$ A del canal dependiente de voltaje de calcio

CHRNA4: subunidad $\alpha 4$ del receptor de acetilcolina

CHRNB2: subunidad $\beta 2$ del receptor de acetilcolina

CLCN1: proteína 1 del canal de voltaje de cloro

Clc- α : canal de cloro alfa

CyO: “curly of oster”

DGRP: panel de referencia genético de *Drosophila melanogaster*

D. melanogaster: *Drosophila melanogaster*

DM: *Drosophila melanogaster*

DNasa: desoxiribonucleasa

GABA: ácido aminobutírico

GAL4: factor de transcripción sensible a galactosa

GEFS+: epilepsia generalizada con crisis febriles plus

HD: dominios de homología

iPSC: células madre de pluripotencia inducida

Kb: kilobases

KCNQ: subfamilia Q de los canales de potasio dependientes de voltaje

KCNQ3 : subfamilia de los canales de potasio dependientes de voltaje

KO: "knock-out"

nAChR α 1: receptor nicotínico α 1 de acetilcolina

nAChR α 4: receptor nicotínico α 1 de acetilcolina

Nav: canal de sodio dependiente de voltaje

Nipagín: methyl 4-hydroxybenzoato

NMJ: uniones neuromusculares

P21: 21 días post-natales

para: "paralitic"

***para*^{bss1}:** gen "paralitic" con alelo "bang" sensitive

PAX6: "paired box 6"

PCA: análisis de componentes principales

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PCRC: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

PV: parvalbúmina positivas

rcf: fuerza centrífuga relativa

RMN: resonancia magnética nuclear

RNasa: ribonucleasa

rp49: proteína ribosomal L32

S: segmento transmembrana

SCN: canal de sodio dependiente de voltaje

SE: estatus epiléptico

SNC: sistema nervioso central

SNP: sistema nervioso periférico

SUDEP: muerte súbita e inesperada en la epilepsia

toy: "twin of eyeless"

TRiP: proyecto de transgénesis ARNi

UAS: secuencia activadora aguas arriba

UV: universitat de València

VNC: cordón nervioso ventral

5-HTP: serotonina 5-hidroxitriptófano

introducción

Introducción

Los canales de sodio

Los canales de sodio son complejos proteicos transmembrana que en condiciones estándar, debido al potencial de membrana, controlan el paso de este ion desde el espacio extracelular hacia el espacio intracelular. Su apertura está regulada por la comunicación interneuronal durante las sinapsis y la liberación de neurotransmisores (Mao et al., 2019). Con la entrada de sodio a la célula se produce una despolarización del potencial de membrana que cuando viaja a lo largo del axón genera un potencial de acción y en última instancia provoca de nuevo la liberación de neurotransmisores y el reinicio del ciclo. El mecanismo subyacente a la generación de los potenciales de acción es un proceso altamente sofisticado en el que también participan, entre otros, los canales de potasio y calcio y la bomba de sodio potasio (Bayona, 2017).

La homeostasis del organismo depende del correcto funcionamiento de este fenómeno, ya que es esencial en multitud de funciones vitales. Por ejemplo, en las neuronas sensoriales primarias, cuando un axón se despolariza por un estímulo dañino esta información viaja a través del sistema nervioso hasta el cerebro donde se percibe como dolor. En las células cardiacas y del musculo esquelético, los potenciales de acción provocan la contracción muscular que regula el flujo sanguíneo y los movimientos corporales (Manuel de Lera Ruiz, 2015).

Los canales de sodio tienen una subunidad funcional alfa formada por cuatro dominios homólogos (HD 1-4) que se organizan en torno al poro del canal. También contienen diversas subunidades beta asociadas que modulan el tráfico y sus propiedades biofísicas (Steinlein, 2014; Catterall, 2014; Littleton & Ganetzky, 2000). Cada uno de los cuatro dominios homólogos contiene seis segmentos transmembrana alfa helicoidales (S1-S6) conectados por bucles de aminoácidos (aa) intra o extracelulares. El dominio corto que conecta el S5 y S6 se hunde en la membrana y forma el poro de selectividad al sodio. Por otra parte, la unión de S1-S4 es la que crea la parte sensible

al voltaje (Kalume et al., 2013; Sato et al., 2001; Stühmer et al., 1989). En concreto el segmento S4 activador del canal contiene aa positivos que usa como detectores de voltaje y por el cual circulan los residuos cargados negativamente. En el bucle intracelular del poro que conecta HD3 y HD4 se produce la inactivación rápida del canal (Catterall, 2014). En la siguiente imagen se puede visualizar una recreación tridimensional de los canales (Figura 1)

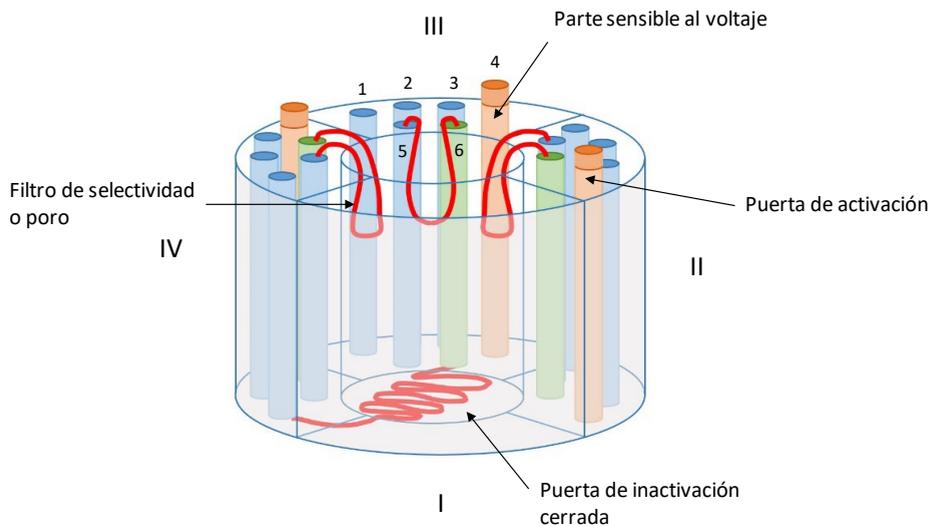


Figura 1. Estructura visual de los canales de sodio. Se puede ver el conjunto estructural que forma cada una de las partes y los segmentos más importantes.

Existen gran cantidad de moléculas que pueden regular la función de los canales de sodio. Su origen es muy variado, desde neurotoxinas como la tetradotoxina, la batracotoxina de bacterias y plantas marinas, hasta toxinas peptídicas como protoxinas de los venenos de los escorpiones y arañas (Richards et al., 2018). También se han diseñado fármacos anticonvulsivos, antiarrítmicos, antidepresivos, anestésicos...Sin embargo, debido a la gran homología entre los todos los canales de sodio, estas sustancias son altamente inespecíficas y tienen un índice terapéutico bajo. Todas estas moléculas naturales o sintetizadas que modulan los canales de sodio se clasifican en bloqueadores del poro o modificadores de su apertura (Li & Chen, 2018).

Origen y clasificación

En comparación con los canales de calcio y de potasio, el origen de los canales de sodio es relativamente reciente. El estudio de la organización de sus intrones y exones sugiere que los canales de sodio evolucionaron a partir de los canales de calcio. Esta teoría se basa en la alta similitud que existe entre los dominios correspondientes de ambos canales (Spafford et al., 1998). A su vez, los canales de sodio y calcio que conocemos actualmente se formaron a partir de dos rondas de duplicación a partir de un canal de potasio simple (Li & Chen, 2018).

Los canales de sodio se han identificado en gran variedad de animales, desde insectos hasta vertebrados mamíferos (Ren et al., 2001; Knipple et al., 1994). Las propiedades biofísicas, farmacológicas, de organización génica, e incluso los sitios de plegamiento son muy similares dentro de todo este grupo de organismos, añadiendo de este modo valor a la teoría de que los canales de sodio aparecieron antes de la separación entre vertebrados e invertebrados (Yu & Catterall, 2003). Se cree que los canales de sodio jugaron un papel esencial en la aparición del sistema nervioso en animales (Lopreato et al., 2001).

Según la convención internacional de la unión de farmacólogos, la nomenclatura de los canales de sodio, $Na_v1.1a$ por ejemplo, consiste en el símbolo químico del ion al que el canal es principalmente permeable (Na), seguido del regulador fisiológico, el voltaje (v) en este caso en subíndice (Na_v). El número que sigue al subíndice indica la subfamilia génica (Na_v1) y el número siguiente la isoforma ($Na_v1.1$). Este último número sigue un orden de descubrimiento. Las variantes de plegamiento para cada miembro de la familia se identifican con letras minúsculas que siguen a los números ($Na_v1.1a$) (Catterall et al., 2019).

En humanos hay 9 canales de sodio diferentes $Na_v1.1-1.9$, codificados por los genes *SCN1A*, *SCN2A*, *SCN3A*, *SCN4A*, *SCN5A*, *SCN8A*, *SCN9A*, *SCN10A*, y *SCN11A* respectivamente. La estructura básica compuesta por los cuatro dominios de

homología con el sensor de voltaje y el poro está altamente conservada entre todos ellos. Alteraciones en la función de estos genes provocan patología en sistema nervioso central y periférico (SNC y SNP respectivamente), y en sistemas neuromusculares como el corazón (Li & Chen, 2018; Brunklaus et al., 2014). En la Tabla 1 se muestra toda esta información más detallada y estructurada.

Isoforma	Gen	Homología*	Tejido	Patologías asociadas
Nav1.1	SCN1A	90%	SNC, SNP	Epilepsia
Nav1.2	SCN2A	91%	SNC, glía	Epilepsia, autismo
Nav1.3	SCN3A	90%	SNC, glía	Epilepsia
Nav1.4	SCN4A	77%	Músculo esquelético	Miotonía
Nav1.5	SCN5A	49%	Músculo cardíaco	Trastornos del ritmo cardíaco
Nav1.6	SCN8A	86%	SNC, SNP, glía	Ataxia, enfermedades de las motoneuronas
Nav1.7	SCN9A	100%	Neuronas sensitivas	Dolor
Nav1.8	SCN10A	77%	Neuronas sensitivas	Dolor
Nav1.9	SCN11A	70%	Neuronas sensitivas	Dolor

Tabla 1. Isoformas, genes, homologías, tejidos de expresión y patologías asociadas de los canales de sodio humanos. Información de la base de datos universal de proteínas UniProt, <http://www.uniprot.org>. *La homología de la subunidad alfa se calcula en base a la isoforma más abundante y por tanto canónica, la variante 3 del Nav1.7.

Epilepsia y canalopatías

La epilepsia es un trastorno neurológico con crisis espontáneas y recurrentes que se producen por una hiperexcitación y/o desincronización en los circuitos neuronales (Dare et al., 2021, Catterall, 2018). Es un trastorno común que afecta a un porcentaje entre 1% y 3% de la población mundial, lo cual equivale a aproximadamente 50 millones de personas (Dare et al., 2021), y puede ser debida a factores genéticos o adquiridos. La adquirida sería la resultante de un neoplasma, infecciones, enfermedades autoinmunes, golpes, infartos... y representa aproximadamente más de un cuarto de los casos totales. La epilepsia más común o de causa genética también se llama idiopática. Su herencia es compleja, desde mutaciones monogénicas hasta oligogénicas (Dare et al., 2021). Dentro de este grupo, las mutaciones en canales son las más comunes y están asociadas a gran cantidad de patologías (Deconinck et al., 2009).

SCN1A y el síndrome de Dravet

Las mutaciones en el gen *SCN1A* son las más comunes dentro de las mutaciones en los canales que provocan epilepsia, identificándose en él más de 1250 variantes patogénicas (Ademuwagun et al., 2021; Xie et al., 2020). De hecho, entre todos los genes que provocan epilepsia, las mutaciones en el *SCN1A* son la causa principal. (Ademuwagun et al., 2021; Surovy et al., 2016).

La haploinsuficiencia debida a grandes deleciones y mutaciones truncantes de pérdida de función en codones de parada es más habitual en patologías más graves y con peor pronóstico como el síndrome de Dravet. Por el contrario, la mayor parte de las mutaciones de pérdida de sentido se asocian con otra patología epiléptica menos grave denominada epilepsia genética con crisis febriles (GEFS) (Brunklau et al., 2014). Ambas patologías son dominantes, pero aquellas que provocan GEFS son normalmente heredadas mientras que en el síndrome de Dravet tres de cada cuatro

casos se deben a mutaciones “*de novo*” (Ademuwagun et al., 2021; Hirose et al., 2013; De Jonghe, 2011).

La epilepsia genética con crisis febriles o GEFS fue descrita por primera vez por los doctores Berkovic y Scheffer en 1997 y agrupa a un conjunto heterogéneo de patologías con crisis generalizadas y focales e incluye también a muchas otras encefalopatías epilépticas mioclónicas. Los pacientes tienen crisis febriles y afebriles, generalizadas y parciales. Las más comunes son mioclonías (espasmos), atónicas (pérdida del tono muscular), y ausencias (pierden la consciencia y se quedan mirando un punto fijo). Las crisis febriles empiezan en la infancia y normalmente terminan a los cinco años. Si no lo hacen y siguen se le denomina GEFS+. Lo más común es que estas sí acaben a partir de la adolescencia. También se cree en la implicación de otros genes en la enfermedad como el SCN2A, SCN1B o GABRG2 O GABRD (Ravenswaaij-arts et al., 2021).

El síndrome de Dravet es una epilepsia infantil rara (ORPHA:33069) que fue descrita por la psiquiatra y epileptóloga Charlotte Dravet en 1978 (Dravet, 1978). Las crisis aparecen entre los 5-8 meses de edad en niños y niñas sanos. Estas pueden ser febriles y afebriles, tónico-clónicas generalizadas y clónicas unilaterales alternantes. Más tarde, entre 1-4 años aparecen mioclonías focales, ausencias atípicas y atónicas. A partir de los dos años es cuando se puede observar discapacidad cognitiva y motora, y trazados electroencefalográficos alterados (Dravet, 2011). Los pacientes no responden a los tratamientos antiepilépticos habituales porque el mecanismo de acción de la enfermedad es distinto al convencional de la mayoría de tipos de epilepsia. Algunos de los fármacos más habituales para intentar controlar las crisis son el ácido valproico y clobazam. Normalmente estos también se suelen combinar con el estiripentol o el topiramato. La dieta cetogénica y otros fármacos como el clonacepam, leviteracetam, zonesamida, fenobarbital son también alternativas viables. El cannabidiol de origen vegetal altamente purificado está autorizado para pacientes desde los dos años. La estimulación del nervio vago o la cirugía (callostomía) son otras opciones plausibles. (Villanueva et al., 2021; Apoyo Dravet, 2017; Gataullina & Dulac,

2017). Algunas crisis alcanzan el estado epiléptico cuando duran más de 20 minutos y tiene un índice de mortalidad de los más elevados entre los síndromes epilépticos.

Otros problemas que presentan los afectados serían las alteraciones en la capacidad de atención y de aprendizaje en general. Algunos pacientes también muestran síntomas del espectro autista. Las dificultades motoras como falta de coordinación, velocidad y precisión también están muy presentes en su vida diaria. Sus dificultades ortopédicas se traducen en escoliosis y pies vagos entre otros. También pueden mostrar trastornos del sueño e hiperactividad (Guerrini, 2012). Si bien es cierto que existe una gran variabilidad sintomatológica entre los afectados, la calidad de vida de los mismos y de sus familiares se ve gravemente mermada. Su incidencia global es menor a 1 por 40.000. Se calcula que en España debiera haber más de 1000 afectados. Actualmente, se estima que hay unos 250-350 afectados correctamente diagnosticados (Hurst, 1990). Para su diagnóstico se usa el test de Hattori en el que se observa diferentes parámetros de las convulsiones durante el primer año de vida. Normalmente se realiza con la ayuda de un médico, y si se obtiene una puntuación alta se procede a la secuenciación del gen.

Modelos animales e investigación en el síndrome de Dravet

La epilepsia se caracteriza principalmente por una hiperexcitabilidad cerebral, de modo que cuando se comprobó que las primeras mutaciones en el gen *SCN1A* provocaban una pérdida de función de los canales, y por tanto una reducción en las corrientes y en la excitabilidad, hubo una controversia que se resolvió con la generación de modelos animales.

Los primeros modelos de ratón *Scn1a*^{-/-} desarrollaron ataxia y murieron a los 15 días postnatales, mientras que los ratones *Scn1a*^{+/-} mostraron crisis espontáneas y muertes esporádicas después de 21 días de vida (Catterall, 2014; Ogiwara et al., 2007; Yu et al., 2006). La alteración más interesante observada en ambos fue una disminución en la excitabilidad de las interneuronas inhibitorias gabaérgicas, lo cual se demostró a

posteriori que conducía a una hiperexcitación en las neuronas piramidales que en última instancia daría lugar al fenotipo epiléptico en los pacientes de síndrome de Dravet (Mantegazza & Broccoli, 2019; Schutte et al., 2016; Hedrich et al., 2014).

Estos modelos también presentaron menor amplitud en las corrientes de sodio y potenciales de acción en las neuronas de Purkinje cerebelares, lo cual podría derivar en ataxias. Las disminuciones de expresión en otras interneuronas gabaérgicas a lo largo del cerebro serían las que darían lugar al resto de síntomas: trastornos del sueño y ritmo circadiano, discapacidad cognitiva y espectro autista (Catterall, 2014; Ogiwara et al., 2007; Yu et al., 2006).

Se siguieron generando modelos en los que se alteró la expresión del gen de manera condicional en diferentes partes del cerebro y de este modo se observó que la pérdida de función de Nav1.1 en las neuronas excitatorias apenas presentaba anormalidades, mientras que si se hacía en las inhibitorias los ratones tenían crisis y muerte prematura (Ogiwara et al., 2013). A pesar de no conocer el mecanismo exacto por el cual las neuronas excitatorias tenían un papel en la enfermedad, en modelos de iPSC (células madre de pluripotencia inducida) de pacientes con síndrome de Dravet se observó aumentos en las corrientes de sodio en estas neuronas excitatorias piramidales y bipolares (Mantegazza & Broccoli, 2019). En ratones *Scn1a*^{+/-} tampoco se podía ignorar que el inicio de las alteraciones en la excitabilidad de las neuronas piramidales durante la tercera semana coincidía con el inicio de las crisis y su muerte prematura. La disminución de la expresión en estas neuronas aminoró las crisis y su fallecimiento a causa de la delección en las neuronas inhibitorias (Ogiwara et al., 2013). Todos estos resultados dejaron entrever el papel de las células excitatorias en la epileptogénesis derivada de mutaciones en el gen *SCN1A*.

Otro modelo con una mutación truncante de pérdida de sentido de la enfermedad *Scn1a*^{R1407X/+} presentó fenotipos muy similares a los modelos KO ("knock-out") de escisión homo y heterocigotos. Esto era de esperar debido a que esta mutación no permite la generación de una proteína funcional. Se observó que Nav1.1 se localizaba

en el segmento inicial de los axones de las interneuronas gabaérgicas, en concreto, las parvalbúmina positivas (PV) (Ogiwara et al., 2007). Más tarde se vio que la haploinsuficiencia del *SCN1A* alteraba la excitabilidad de estas neuronas PV y las interneuronas de la quinta capa del neocortex que expresaban somastatina, lo cual resultaba en una desinhibición de las células piramidales excitatorias y otras de la red cortical (Tai et al., 2014). Estudios posteriores se han centrado en la implicación de estas alteraciones en zonas concretas del cerebro. La escisión del gen en la zona del hipocampo aumenta la sensibilidad a las crisis provocadas por el aumento de la temperatura corporal, además de presentar crisis espontáneas y déficits cognitivos (Stein et al., 2019). Algo parecido sucedió cuando se eliminó la expresión en las zonas corticales. Todo esto demuestra que las crisis focales pueden iniciarse en múltiples zonas del cerebro y derivar a su vez en crisis generalizadas, poniendo en valor la importancia de las diferentes zonas cerebrales en el transcurso de la patología.

Actualmente el repositorio de Jackson cuenta con tres cepas diferentes de ratón para el estudio del síndrome de Dravet. Dos de ellas son las anteriormente mencionadas, *Scn1a*^{-/-} y *Scn1a*^{R613X}. La tercera es la cepa *Scn1a*^{A1783V}, la cual presenta la mutación asociada al síndrome de Dravet A1783V en presencia de la recombinasa Cre. Estos ratones heterocigotos muestran muchos de los fenotipos asociados al Dravet como las crisis espontáneas, mortalidad prematura, ansiedad, hiperactividad, y otros problemas cognitivos y musculares. Estos efectos están fuertemente influenciados por el fondo genético. Cabe destacar que este ratón fue financiado por una asociación de pacientes de la patología y es de acceso libre (Jackson, 2020). En la tabla 2 se muestra los principales modelos de ratón del Dravet.

Genotipo	Fenotipo
<i>Scn1a</i> ^{-/-}	Ataxias y muerte prematura en 15 días
<i>Scn1a</i> ^{+/-}	Crisis espontaneas y muertes esporádicas tras 21 días de vida
<i>Scn1a</i> ^{R613X/R613X}	Crisis espontaneas y muerte prematura tras 16 días de vida
<i>Scn1a</i> ^{R613X/+}	Crisis y muertes espontáneas tras 18 días de vida, 60% de supervivencia tras 3 meses
<i>Scn1a</i> ^{A1783V/+}	Crisis espontaneas, mortalidad prematura, problemas motores, hiperactividad y déficits cognitivos

Tabla 2. Genotipo y fenotipo de los principales modelos de ratón de síndrome de Dravet

Sistemas de expresión heteróloga

El primer modelo empleado para investigar las mutaciones del *SCN1A* ligadas a epilepsia fueron los sistemas de expresión heteróloga. Para la generación de estos modelos se clonaba las subunidades alfa de los canales de sodio en diferentes tipos de células: ovocitos de *Xenopus* o ranas y de hámster chino, o células embrionarias de riñón (HEK o tsA201). Estas células proporcionan un ambiente idóneo para analizar las propiedades exógenas y endógenas de las células, además de ser accesibles a nivel electrofisiológico. Los estudios en estos modelos fueron los primeros en demostrar que algunas mutaciones de pérdida de sentido causaban pérdida de función y otras ganancias. Se demostró así que los mecanismos pueden ser muy variados y afectar desde el número de canales, la conductancia como a la cinética del canal (Catterall et al. 2010; Escayg y Goldin 2010). El cribado de fármacos en estos modelos ayudó a descubrir compuestos que regulaban diferentes tipos e isoformas de los canales de sodio. La variabilidad en los resultados obtenidos sobre las propiedades de los canales tras su clonación en diferentes tipos celulares demostró que la señalización intracelular afectaba a las corrientes persistentes (S. S. Schutte et al., 2016).

iPSC

Las diferencias genéticas y de desarrollo entre animales y humanos han sido abordadas con los modelos de células madre pluripotentes inducidas generadas a partir de muestras de pacientes. Con estos modelos también se ha podido caracterizar los efectos de algunas mutaciones sobre las corrientes de sodio (Higurashi et al., 2013; Jiao et al., 2013). La diferenciación a cardiomiocitos también ha sido muy útil a la hora de estudiar la muerte súbita en los pacientes del síndrome de Dravet. Se observaron alteraciones en la excitabilidad intrínseca de las células cardíacas, las cuales podrían incrementar el riesgo de muerte súbita (Mantegazza & Broccoli, 2019).

Algunas de sus limitaciones son la incapacidad de formar circuitos neuronales sincronizados (Kuijlaars et al., 2016). Los nuevos campos de estudio están intentando resolver esto a través de los cultivos tridimensionales y la generación de organoides (Izsak et al., 2019; Trujillo et al., 2019; Zafeiriou et al., 2020). También presentan falta de correlación entre los estadios de desarrollo de los cultivos *in vitro* con los de organismos vivos. Los protocolos para la generación de estas iPSC de pacientes han evolucionado rápido, aunque también han mostrado cierto grado de variabilidad en las neuronas obtenidas y su grado de maduración (Maroof et al., 2013; Zhang et al., 2013). El futuro pasa por acortar los tiempos a la hora de generar células gabaérgicas completamente funcionales (Yuan et al., 2018; Bagley et al., 2017). Estos modelos también son interesantes para el cribado de fármacos e incluso para tratamientos con trasplantes (Mantegazza & Broccoli, 2019).

Pez cebra

El pez cebra es un animal vertebrado sencillo genéticamente con una considerable homología con los vertebrados más complejos. Se estima que el 76% de los genes humanos implicados en enfermedades tiene su ortólogo en este organismo (Howe et al., 2013). Su tiempo de generación es corto y su descendencia numerosa, entre 50 y 200 embriones de una pareja de adultos cada semana, por lo que se considera un

animal de experimentación muy útil en lo que se refiere al cribado de fármacos a gran escala y la identificación de mutaciones supresoras (Marshall et al., 2021; Hortopan et al., 2010).

Las crisis se caracterizan por nado hiperactivo acompañado de una pérdida de la postura habitual. Acontecen y se pueden medir electrofisiológicamente tanto en adultos como larvas, estas últimas son transparentes por lo que se pueden visualizar directamente empleando reporteros genéticos (Burrows et al., 2020). Las crisis se pueden provocar tanto añadiendo convulsivos al agua como genéticamente (Afrikanova et al., 2013; Baraban et al., 2013). Algunos de los medicamentos comúnmente usados en humanos también son capaces de suprimir sus crisis siendo su respuesta a estos tratamientos similar a ratón (Leclercq et al., 2015). Por ejemplo, el clezomile se identificó en un modelo del síndrome de Dravet en este organismo (Baraban et al., 2013).

La complejidad técnica la hora de introducir de mutaciones causantes de enfermedades en este organismo retrasó su uso para el estudio de algunas enfermedades, lo cual se resolvió unos años atrás gracias a los avances en técnicas de edición genética como el CRISPR (Hwang et al., 2013).

Drosophila melanogaster

Drosophila melanogaster (DM) o mosca de la fruta es uno de los modelos con más historia en el mundo de la investigación. Se trata de un modelo fácil de manipular y con un ciclo de vida corto, de 10 días aproximadamente, que da lugar a gran cantidad de descendientes. Su manipulación es sencilla y la ausencia de comités éticos también facilita su trabajo en los laboratorios. Además, su coste en comparación con otros organismos superiores es mucho más bajo. Su genoma presenta un 60% de similitud con el humano, es menos redundante, y se estima que el 75% de los genes implicados en enfermedades tienen su ortólogo en este organismo (Pandey & Nichols, 2011; Ugur

et al., 2016). Por todo ello, es considerado un modelo muy útil para descubrir los mecanismos moleculares de las enfermedades e incluso para probar tratamientos.

A pesar de las diferencias entre el sistema nervioso de vertebrados e invertebrados, la conservación de las moléculas que regulan la función neural, los canales de sodio y las proteínas que participan en la transmisión sináptica son muy comparables. Existe gran homología en los canales de voltaje: Na^+ , K^+ , y Ca^{2+} , y en los de ligando: acetilcolina (ACh), glutamato y receptores de ácido gamma aminobutírico (GABA) (Song & Tanouye, 2009). En la siguiente imagen se muestran algunos de los principales órganos y sistemas de *Drosophila melanogaster* (Figura 2).

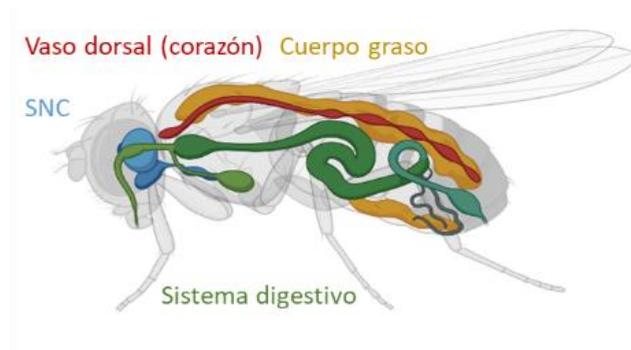


Figura 2. Representación gráfica de los órganos de *Drosophila melanogaster*. Imagen obtenida de Biorender.

Las similitudes entre las crisis de humanos y *Drosophila melanogaster* denotan su potencial como modelos de epilepsia: ambos tienen mutaciones equivalentes que dan lugar a las crisis, estas aparecen tras un umbral determinado, la susceptibilidad a las mismas se puede regular por mutaciones genéticas, la actividad epiléptica se extiende a través del sistema nervioso central siguiendo las rutas de las conexiones sinápticas, e incluso el fenotipo epiléptico de las moscas puede aminorar por el uso de diferentes anticonvulsivos como los que se usan en humanos: valproato sódico, fenitoína, gabapentina y bromuro de potasio (Song & Tanouye, 2008). Los ensayos realizados para la evaluación de las crisis son robustos, lo que permite la identificación de mutantes y la supresión de dicho fenotipo. Los protocolos de electrofisiología están

estandarizados por lo que la caracterización del funcionamiento de los canales es una gran herramienta disponible para el estudio de la fisiopatología en epilepsia (Kroll et al., 2015).

Según la estructura virtual de sus canales, las regiones clave para su función muestran una gran conservación a nivel de aa, incluyendo el S4 sensor de voltaje y el segmento citoplasmático entre los dominios 3 i 4. En cambio el segmento transmembrana muestra entre un 50-80% de identidad (Schutte et al. 2016).

Existen multitud de herramientas para la manipulación genética y la generación de modelos en *D.melanogaster*. La mutación *para*^{bss1} por ejemplo, no es equivalente a ninguna mutación humana, pero presenta un fenotipo muy similar al del síndrome de Dravet, por lo que se usa como modelo de esta y otras epilepsias intratables (Dare et al., 2021; L. Parker, Padilla, et al., 2011). También se han hecho modelos de las mutaciones relacionadas con GEFS+ (*SCN1A*^{K1270T}), y el síndrome de Dravet (*SCN1A*^{S1231R}) empleando técnicas de recombinación homóloga. Estos modelos mostraron un fenotipo de crisis asociadas a un aumento de la temperatura corporal del organismo tras sumergir los tubos en agua caliente. Estas se caracterizaron como una pérdida de la movilidad acompañada por un movimiento continuo de patas, alas o incluso abdomen. Los resultados también mostraron que las moscas de síndrome de Dravet fueron más sensibles a las crisis inducidas por temperatura que las GEFS.

El análisis de las corrientes de sodio en las neuronas gabaérgicas definió la mutación causante de síndrome de Dravet como pérdida de función, al contrario que la responsable de GEFS, la cual se caracterizó como ganancia. El genotipo síndrome de Dravet también mostró una reducción en la frecuencia de disparo a temperatura ambiente y superiores, de manera similar a los resultados obtenidos en ratones donde la disminución de las corrientes de sodio provocó una pérdida de excitabilidad en las interneuronas gabaérgicas (Sun et al., 2012). También se comprobó el potencial del precursor de la serotonina 5-hydroxytryptophan (5-HTP) como supresor de las crisis en el genotipo síndrome de Dravet (R. J. Schutte et al., 2014). Este resultado fue

concluyente con los datos obtenidos en dos estudios clínicos que emplearon inhibidores de esta vía como fluoxaitina y el citalopram para el tratamiento de epilepsias refractarias (Albano et al., 2006).

En ratones existen 9 canales diferentes (Yu & Catterall, 2003) y el ratio de canales mutados es diferente en neuronas excitatórias e inhibitorias, por lo que el estudio del efecto de las mutaciones en el gen *Scn1a* se dificulta. En *Drosophila melanogaster*, a pesar de que hay gran variedad de variantes con diferentes propiedades biofísicas en los canales de sodio, todas ellas son producidas por el plegamiento o “*splicing*” alternativo del transcrito del gen *para* (Thackeray & Ganetzky, 1994; O’Dowd et al., 1995; Marley & Baines, 2011). Las mutaciones GEFS Y síndrome de Dravet anteriormente mencionadas están en un exón que se expresa de manera constitutiva y por tanto todos los canales de sodio portan la mutación de manera homocigota. Esto proporciona una oportunidad única para investigar si hay factores detrás de la expresión diferencial de los canales que contribuyan a los efectos específicos de estas mutaciones en neuronas inhibitorias frente a excitatorias.

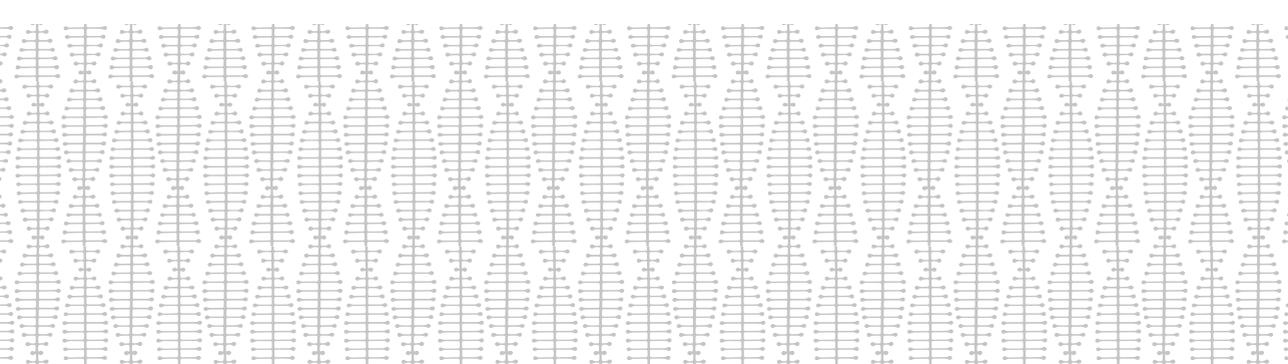
objetivos

Objetivos

1. Generar un modelo KO del gen *para* (*para*^{KO}) a través de la técnica de la recombinación homóloga, y posteriormente un modelo "knock-in" con el gen humano.
2. Analizar posibles alteraciones de las corrientes de sodio y la excitabilidad de las motoneuronas aCC en las moscas *para*^{KO} a través de experimentos de electrofisiología.
3. Caracterizar dichos modelos a distintos niveles: epiléptico, muscular, comportamental, cognitivo y metabólico. Con esto se pretende estudiar si existe una correlación entre la mutación generada y un fenotipo patológico que reproduzca las alteraciones que presentan los pacientes del síndrome de Dravet. Testar si los imanes pueden mejorar las crisis.
4. Identificar modificadores que puedan explicar parte de la variabilidad clínica asociada al síndrome de Dravet empleando el modelo *para*^{bss1}.
5. Comprobar si distintos fármacos como el bórax y el harmol pueden mejorar el fenotipo epiléptico y la baja supervivencia del modelo *para* *para*^{bss1} respectivamente.

Capítulo I

Generación de un mutante KO del gen *para* en *Drosophila melanogaster* por la técnica de la recombinación homóloga. Validación y caracterización como modelo del síndrome de Dravet



Introducción

La recombinación homóloga

Las técnicas de edición genética constituyen una de las herramientas y aproximaciones esenciales en el campo de la investigación biomédica para el estudio de enfermedades humanas. Algunas de ellas se basan en la generación de un corte de doble cadena en la región a editar del ADN (ácido desoxirribonucleico). Posteriormente este corte es reparado por alguno de los dos mecanismos alternativos de los que dispone la célula. El primero de ellos es la recombinación no homóloga o unión de extremos no homólogos, el cual consiste en la unión de los extremos generados introduciendo mutaciones adicionales al generar deleciones o inserciones en la zona de unión. La otra opción sería la recombinación homóloga, la cual emplea como molde para la reparación la región equivalente del cromosoma homólogo, o un fragmento de ADN exógeno provisto artificialmente para llevar a cabo la unión de los extremos. Algunos de los desafíos a los que se enfrentan estas técnicas serían la generación de los cortes y la reparación de manera eficiente y precisa y que ambas se produzcan en estadios de desarrollo lo suficientemente tempranos para no generar mosaicos (Liu et al., 2012; Huang et al., 2008; Xie & Golic, 2004).

Una de las revoluciones de los últimos años es la tecnología CRISPR/Cas9, un sistema inmune adaptativo de microorganismos. Estos son capaces de crear un catálogo de los ADN virales con los que se van encontrando y contra los que generan ARN guías combinados con la nucleasa Cas9, la cual es la encargada de cortarlas y eliminarlas. El estudio, desarrollo y optimización de este mecanismo planteó la posibilidad de utilizar esta técnica en otros sistemas celulares guiando a la nucleasa Cas9 hacia otras secuencias. Con la simple síntesis de un ARN guía esta proteína es capaz de cortar el gen que se quiera editar. Aunque esta técnica es mucho más simple y accesible que los métodos anteriormente mencionados, comparte parte de sus limitaciones con ambas (Giono, 2017).

En este trabajo se ha empleado la recombinación homóloga como técnica de edición genética por su alta especificidad. En concreto se ha usado una aproximación de la misma desarrollada por el Dr. Baena para generar un KO del gen *para* en *Drosophila melanogaster* (Baena-Lopez et al., 2013). En esta aproximación, se parte de un vector de transgénesis denominado *pTV cherry* basado en el elemento transponible P, de forma que al inyectarlo en embriones de mosca junto con una fuente de transposasa se pueden generar inserciones al azar de toda la construcción. En la Figura 3 se muestra el vector:

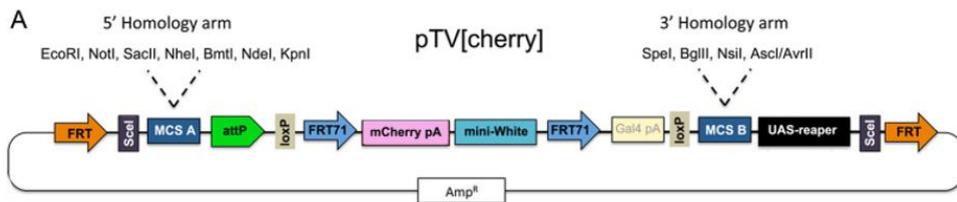


Figura 3. Esquema del vector *pTV cherry*. Este plásmido contiene dos sitios de clonación múltiple (MCSA Y MCSB) donde se incorporan los brazos de homología cercanos a región que se quiere escindir. También consta de fragmentos FRT y Scel, los cuales permiten la escisión del ADN circular tras su inserción y la linealización del mismo, respectivamente. La secuencia UAS-reaper permite la eliminación de falsos positivos. Los marcadores mCherry y mini-white hacen posible el seguimiento del inserto, y al estar flanqueados por regiones loxP se pueden eliminar fácilmente con ayuda de la proteína Cre. La región attP permite la inserción de un nuevo fragmento a la zona de recombinación anterior mediante el sistema del fago PhiC31. Imagen reproducida con el permiso de The Company of Biologists de Baena-López et al., 2013.

A continuación se explica con más detalle todas las herramientas de las que dispone el vector junto con su uso en el proceso de elaboración de mutantes KO. El primer paso consiste en la clonación de los fragmentos flanqueantes a la región genómica a escindir en los MCS correspondientes a brazos de homología 5' y 3'. Posteriormente este vector se inyecta en embriones junto con otro plásmido que expresa la transposasa del elemento P. Entonces se produce la inserción al azar gracias a las repeticiones invertidas del elemento P sobre las que actúa la transposasa. Los embriones que nacen son moscas quiméricas que incorporan el inserto en algunas células pero no en otras. Para seleccionar aquellas moscas que tienen el inserto en la

línea germinal se cruzan todas las nacidas con una cepa de ojo blanco que contiene múltiples cromosomas equilibradores para al mismo tiempo mapear en que cromosoma se ha insertado el fragmento. Por tanto, de estos cruces se obtienen moscas de ojo rojo, gracias al gen *mini-white* del vector, y se sabe en qué cromosoma está la inserción (Figura 40). Entonces se selecciona la cepa con la inserción en el cromosoma que se desee como donante de la construcción para la recombinación homóloga.

Posteriormente esta descendencia se cruza con otra cepa (*hs-Flp*, *hs-SceI*) que expresa la recombinasa Flp y el enzima de restricción *SceI* bajo un promotor de choque térmico a 37°C durante una hora en los estadios larvarios II y III (Figura 4). La proteína Flp cataliza la recombinación entre los sitios FRT y la escisión de un ADN circular, que posteriormente se linealiza mediante la digestión por *SceI*, generando un ADN lineal y activando los mecanismos de reparación por homología.

En la descendencia de este cruce la inserción se escinde de forma estocástica, en unas células sí y en otras no. De nuevo se usa el gen *mini-white* de color de ojos para seguir la inserción, aunque en esta situación es algo más compleja porque las células de color rojo pueden ser debidas a la no escisión, a la escisión más reinserción por recombinación homóloga, y menos frecuentemente por inserción inespecífica en otro locus. Para distinguir la recombinación homóloga de las otras dos posibilidades, se cruzan estas moscas de ojos mosaico con otras que contienen una inserción *ubi-Gal4* para la expresión ubicua del factor de transcripción Gal4. En las células donde se haya producido recombinación homóloga, *UAS-reaper*, que codifica para la proteína proapoptótica Reaper bajo el promotor al que se une Gal4, se elimina. En cambio, las células sin escisión o con reinserción inespecífica mueren. Estas moscas *ubi-gal4* también contienen la proteína fluorescente GFP como marcador fácilmente eliminable. Por tanto, después de todo el proceso, se reemplaza la secuencia diana de la recombinación homóloga por la construcción contenida entre ambos brazos de homología, incluyendo la secuencia attP la cual permite la reinserción otros fragmentos de ADN, los sitios *loxP* y los marcadores fenotípicos.

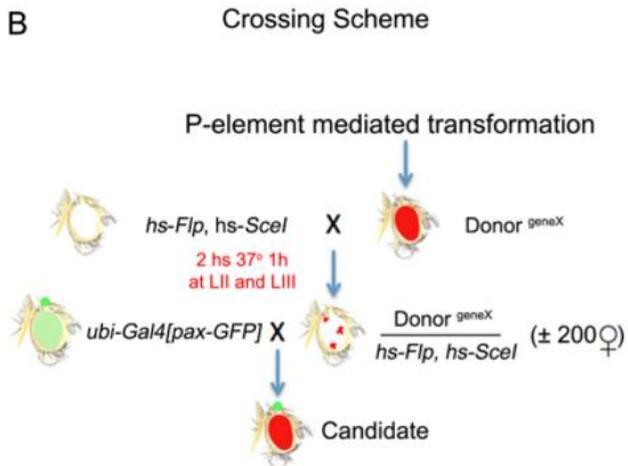


Figura 4. Cruces necesarios para la obtención del candidato a KO. Imagen reproducida con el permiso de The Company of Biologists de Baena-López et al., 2013.

En este capítulo se van a abordar los objetivos 1 y 3 de esta tesis doctoral, es decir, la generación del modelo *para*^{KO}, su posterior caracterización como modelo del síndrome de Dravet y el uso de imanes para tratamiento del fenotipo epiléptico.

Resultados

Diseño y proporciones de la recombinación homóloga

Para diseñar las secuencias a clonar que se corresponderían a los brazos de homología se escogió regiones flanqueantes al primer exón codificante para romper la pauta de lectura y no generar proteínas truncadas. Esta región era la más grande, funcional y conservada entre humanos y *D. melanogaster* (Bahceci et al., 2020). En cuanto al diseño molecular el tamaño de los brazos de homología fue de 951pb en el caso del brazo A y de 782pb en el caso del brazo B, generando así una delección de 12pb incluyendo al codón de inicio. Tras su clonación en el vector pTV cherry, este fue enviado al servicio de transgénesis de *Drosophila melanogaster* del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa para su microinyección en embriones de la cepa *w*. De los 200 embriones inyectados aproximadamente, 68 llegaron a estadio de pupa, pero solo 56 nacieron. 21 fueron hembras y 35 machos, 4 de los machos fueron estériles. Se contabilizaron cerca de 3000 moscas de la descendencia de los individuos fértiles y se recuperaron dos machos de ojos rojos que portaban la inserción, uno de ellos en el cromosoma II y otro en el III. Se seleccionó la inserción en el cromosoma III como donante para la edición. El evento de escisión y reinserción correcta es raro (1/8.000) y en este caso, teniendo en cuenta que las mutaciones nulas en el gen *para* son letales embrionarias, los machos hemizigóticos iban a ser letales, haciendo la selección la mitad de eficiente. Para cada intento, se realizaron 70 cruces individuales para obtener alrededor de 200 hembras vírgenes mosaico. Después de realizar el cruce final con estas hembras se contabilizaron alrededor de 5.000 moscas hasta que apareció una la candidata definitiva de ojos rojos. Esta fue descartada como falso positivo al comprobar que el color de ojos rojo no segregaba con el cromosoma X, sino con un autosoma. Por tanto, debía tratarse de una inserción en otro locus genético mediante recombinación incorrecta. Lo mismo sucedió para un segundo candidato. Este proceso se repitió hasta en tres ocasiones, contabilizando un total de 15.000 moscas hasta que se obtuvo la candidata definitiva cuya validación molecular se detalla a

continuación. También se recogieron moscas hermanas de ojo blanco en la cuales no se había producido la recombinación homóloga como controles.

Validación KO

El vector *pTV cherry* contenía la secuencia codificante para la proteína fluorescente roja *mCherry* bajo un promotor débil que no era capaz de promover eficientemente su transcripción. Esta solo se expresaría si se situaba cerca de un intensificador transcripcional y reproducía el patrón de expresión del gen diana. En este caso, se detectó fluorescencia roja exclusivamente en la cabeza de las moscas, donde se sitúa la mayor parte del sistema nervioso de las moscas (imagen no mostrada). Tras esto se pasó a hacer la validación molecular por PCR convencional. Para ello, se diseñaron dos pares de cebadores para analizar los extremos 5' y 3' de la inserción. Para el extremo 5' se diseñó un cebador directo complementario a la secuencia genómica aguas arriba del brazo de homología, y un cebador reverso basado en la secuencia del vector. Para el extremo 3', uno directo basado en el vector y uno reverso en la secuencia genómica aguas abajo del brazo de homología. De esta forma solo se produciría amplificación si la inserción se hubiera producido en el sitio correcto, lo cual se comprobó primero por el tamaño del fragmento amplificado, y posteriormente mediante su secuenciación. A continuación se muestra un esquema para facilitar su comprensión (Figura 5).

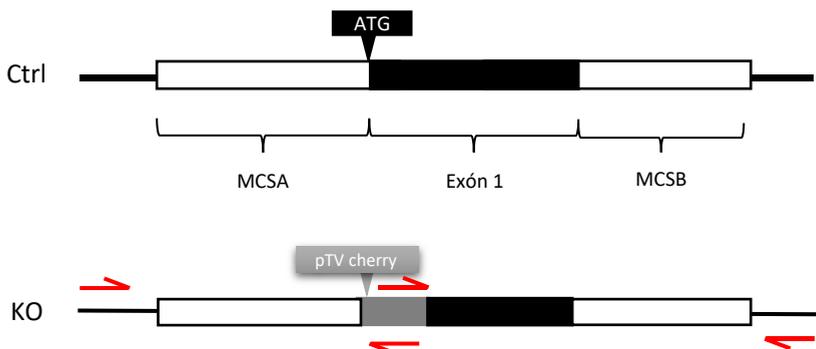


Figura 5. Validación genómica del KO. Representación gráfica de los fragmentos genómicos del gen para de las cepas Ctrl y KO amplificados por PCR, en rojo se representan los cebadores empleados.

Finalmente para analizar la expresión del transcrito del gen se realizó una PCR cuantitativa (PCRc) (Figura 6). Para obtener un valor 0 de expresión se debía tener el alelo knock-out en homocigosis en hembras o hemizigosis en machos, lo cual es letal en larva. Para solventar esta letalidad, se combinó este alelo KO con un cromosoma equilibrador con la proteína GFP, de forma que se pudo seleccionar a la lupa de fluorescencia embriones mutantes que carecían de la proteína verde fluorescente (Figura 6A). También se hizo una PCR cuantitativa en moscas adultas heterocigotas para ver como afectaba el alelo nulo sobre un alelo sano y el nivel de silenciamiento que se estaba alcanzando (Figura 6B).

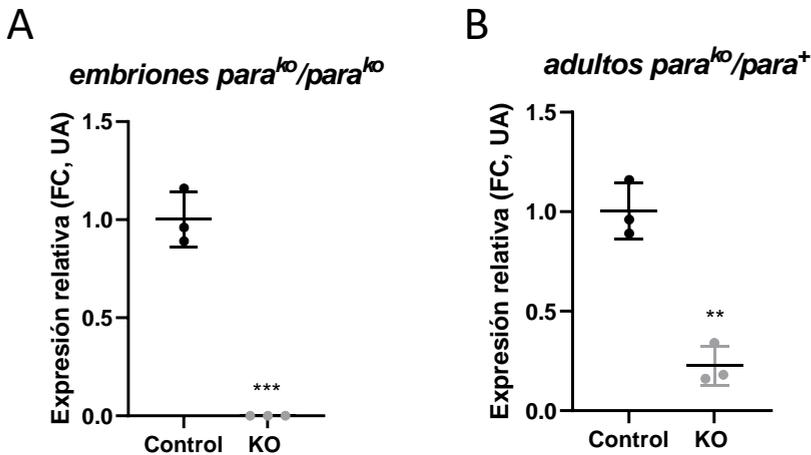


Figura 6. Validación de la disminución de expresión del gen *para* en los mutantes KO homocigotos de embriones (A) y heterocigotos de adultos (B). Expresión relativa del gen obtenida a través de ensayos de PCR cuantitativa normalizada y comparada con el gen constitutivo *rp49*. Los niveles de expresión se muestran como FC (factor de cambio) en unidades arbitrarias y referenciadas al control como valor 1. Para su análisis se empleó el método del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y estadísticamente se hizo el test t de student (**p-valor < 0,01). Datos obtenidos a partir de 15 embriones y moscas adultas respectivamente.

Como cabía esperar, en el caso de los embriones homocigotos la expresión de *para* fue 0. En cambio, para los adultos heterocigotos no se obtuvo una expresión del 50% resultante de la suma del alelo KO con el alelo salvaje, esta fue cercana al 25%. Por tanto no hubo compensación por parte del alelo no mutado, si bien es cierto que cada gen tiene un umbral para funcionar y este puede ser bastante variable.

Por otra parte, para validar la pérdida de función del alelo KO a través de la genética se hicieron cruces con cepas ya descritas de pérdida y ganancia de función y se analizó su fenotipo.

$para^{deficiencia}/para^{deficiencia}$ = pérdida de función letal nulo

$para^{KO}/para^{KO}$ = letal nulo

$para^{deficiencia}/para^{ko}$ = letal nulo

$para^{KO} = para^{deficiencia}$ = pérdida de función

$para^{bss1}/x$ = ganancia de función y fenotipo epiléptico

$para^{KO}/x$ = pérdida de función y fenotipo epiléptico

$para^{KO}/para^{bss1}$ = viable sin fenotipo epiléptico

Tras la comparación con el alelo $para^{deficiencia}$ se pudo concluir que se trataba de una pérdida de función, mientras que comparando con la ganancia de función $para^{bss1}$ fue interesante ver como la compensación de ambos produjo un equilibrio y la consecuente desaparición del fenotipo epiléptico.

Crisis y temperatura

Las crisis epilépticas son uno de los principales síntomas clínicos de la enfermedad, en algunas ocasiones suceden por el aumento de la temperatura corporal de los niños enfermos. En *Drosophila melanogaster* pasa algo parecido, cuando los tubos de mosca

se sumergen en un baño de agua caliente a 40°C entran en crisis. El estado de crisis es visible porque las moscas se quedan inmóviles boca arriba y en algunas ocasiones también tienen espasmos. Como se puede ver en la Figura 7A mientras que muy pocas moscas control entraron en crisis, un porcentaje muy alto de las KO, alrededor del 75% sí lo hicieron. Este resultado confirmaría que la escisión del gen *para* en las moscas también causa uno de los síntomas más claros del síndrome de Dravet. Por otra parte, observado en la figura 7B la evolución de las crisis con el tiempo se vio un aumento exponencial claro a partir de los 30 segundos, alcanzando el 50% en crisis y estabilizándose en 60s en un 80%.

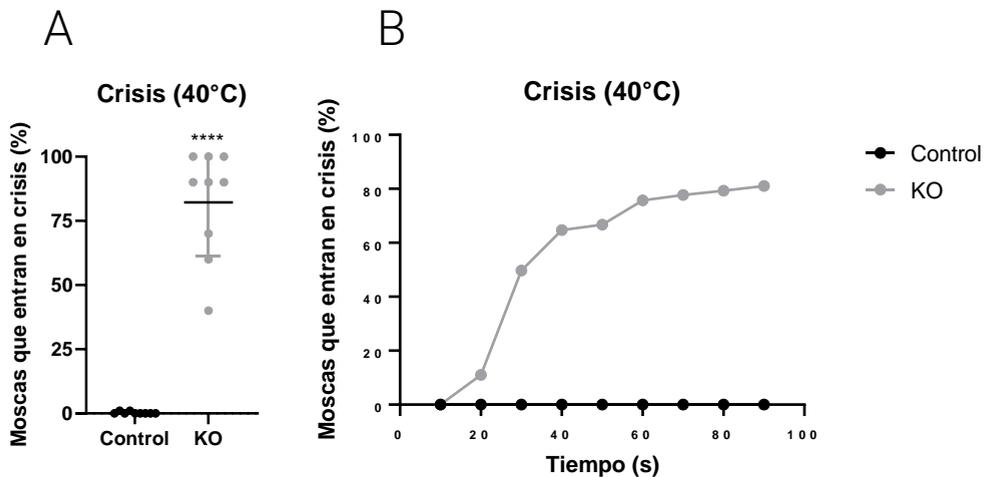


Figura 7. Crisis y su evolución con el tiempo. En la Figura A de la izquierda se muestra el % de moscas que entran en crisis y en la B este % en función del tiempo. Se aplicó el test Mann Whitney (****p-valor < 0,0001). En la figura A cada valor representa un tubo de 10-15 moscas. En la figura B cada punto es la media de todas las muestras ya mencionadas.

Es interesante destacar que las moscas KO no mostraron diferencias visibles a priori con las moscas control sanas, y que la recuperación a las crisis fue inmediata una vez se sacó el tubo del baño caliente. Esto es algo que ya se ha observado en otros modelos de síndrome de Dravet en *Drosophila melanogaster* (R. J. Schutte et al., 2014).

Estatus epiléptico

Otro de los problemas asociados a la enfermedad es un porcentaje considerablemente alto de muertes súbitas. Estas pueden ser debidas al SUDEP (muerte súbita inexplicada del paciente epiléptico) o al SE (status epiléptico), el cual se define como crisis incontroladas de larga duración. El modelo generado no mostró crisis espontáneas por sí mismo, de modo que su supervivencia no fue menor que los controles (resultados no mostrados) y el SUDEP fue descartado como fenotipo de estudio. Este resultado contrasta bastante con los obtenidos en otros modelos animales y pone en entredicho el papel de las crisis en la supervivencia en *D.melanogaster*. Con el estímulo de la temperatura se intentaron reproducir los estatus epilépticos. Para ello se diseñó un experimento en el que las moscas estuvieron durante 30 minutos en el baño de agua caliente, a 37,5°C. A partir de ese momento las moscas KO entraron en crisis, se dejaron 15 minutos en ese estado y luego se cuantificó la cantidad de moscas que no habían sobrevivido a este estímulo (Figura 8).

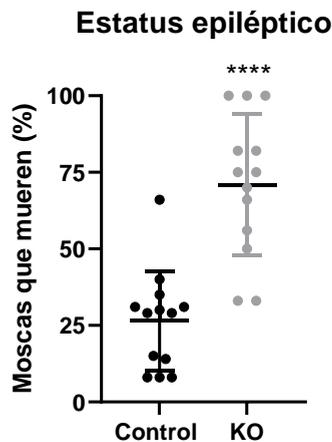


Figura 8. Muerte debida al estatus epiléptico. Se aplicó la prueba t de student (****p-valor < 0,0001). Cada punto representa un tubo de 10-15 moscas.

En la Figura 8 se puede ver como los mutantes KO tienen una supervivencia más baja frente a este tipo de estímulo que los controles sanos. Los resultados de este ensayo son muy interesantes porque la mayoría de modelos se centran en la muerte súbita asociada al fenotipo epiléptico y en su clínica, dejando de lado el estatus epiléptico y excluyendo a los animales que los padecen por ser pocos e impredecibles (Ricobaraza et al., 2019; Kalume et al., 2013). El diseño de este experimento puede aportar nuevas ideas para llevarlo a cabo en organismos superiores y profundizar en sus causas y tratamientos. También llama la atención que hay un porcentaje cercano al 20% de moscas control que también mueren, esto podría ser debido a la intensidad de la estimulación.

Entre el resto de fenotipos de la enfermedad se encuentran los problemas musculares en quienes la padecen. Algunos de ellos son retraso en el desarrollo psicomotor y ataxias. Para estudiar este tipo de síntomas en el modelo *para*^{KO} se plantearon una serie de ensayos para evaluar sus competencias neuromusculares.

Geotaxis negativa

La geotaxis negativa o "*climbing*" es la capacidad de trepar y se define como un comportamiento reflejo que tienen las moscas de subir por las paredes del tubo una vez caen al fondo del mismo. Defectos en este tipo de comportamientos han sido descrito en diferentes modelos de enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson (M'Angale & Staveley, 2016). Para realizar este ensayo se golpeó el tubo sutilmente y todas las moscas cayeron a la base del mismo, a continuación se esperó 10 segundos y se cuantificó la cantidad de moscas que habían superado una altura umbral. Los resultados (Figura 9) mostraron que las moscas KO tenían más dificultades para recorrer la superficie de los tubos, lo cual podía ser prueba de problemas musculares. Mientras que cerca del 90% de las moscas sanas control fueron capaces de superar el umbral, solo el 75% de las KO lo lograron.

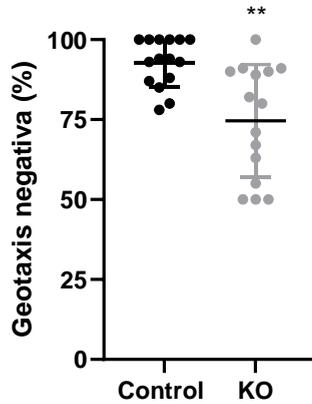


Figura 9. % Geotaxis negativa. Se aplicó el test Mann Whitney (**p-valor < 0,001). Cada punto es un tubo de 10-15 moscas.

Vuelo

El ensayo de vuelo busca cuantificar la capacidad de estabilización de los músculos de las alas de las moscas. Problemas en este tipo de función se han descrito en modelos de patologías que presentan degeneración neuromuscular (Lloyd & Taylor, 2010). Para ello, las moscas fueron lanzadas desde lo alto de un tubo con pegamento, por lo que cuando se intentaron posar en las paredes del mismo se quedaron atrapadas. A continuación se cuantificó la distancia recorrida (Figura 10). Las moscas control lograron estabilizarse en 20 cm y las moscas KO lo hicieron 5 cm más abajo, en 25 cm (Figura 10A). En la Figura 10B se puede ver claramente la distribución desigual de ambos grupos. En el grupo control la mayoría de moscas se agruparon en torno 15 y 30 cm mientras que en el caso del KO los picos más grandes se producen entre 30 y 35cm. Este resultado, al igual que el de la geotaxis negativa (Figura 9) señaló dificultades musculares en las moscas mutantes.

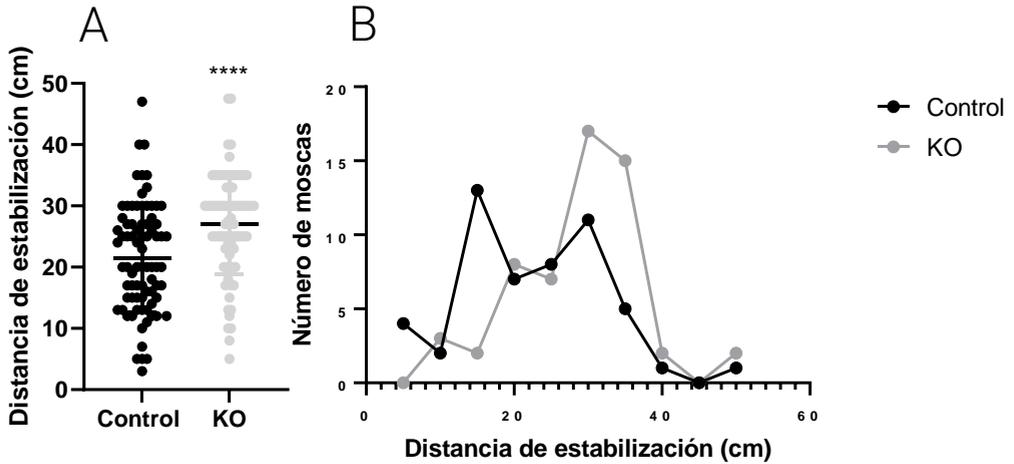


Figura 10. Distancia estabilización vuelo. El apartado A muestra la media, mientras que el B representa mejor la distribución de puntos. Se aplicó el test Mann Whitney (****p-valor < 0,0001). En la figura A cada punto representa a una mosca, mientras que en la B cada valor es la suma de todos ellos dentro del rango establecido.

Locomoción

Otra manera de estudiar los problemas musculares que pudieran tener las moscas mutantes fue estudiando el movimiento de andar. Para este experimento se dejó que las moscas caminaran durante 10 minutos dentro de un circuito circular cerrado denominado arena. Tras esto se cuantificó la distancia recorrida (Figura 11A), la velocidad media (Figura 11B) y el tiempo que pasaron en el centro (Figura 11C). El genotipo KO no caminó tanto como el control, y su velocidad media también fue menor. Ambos datos siguieron la tendencia de la geotaxis negativa (Figura 9) y el vuelo (Figura 10), destacando defectos neuromusculares en las moscas modelo del síndrome de Dravet.

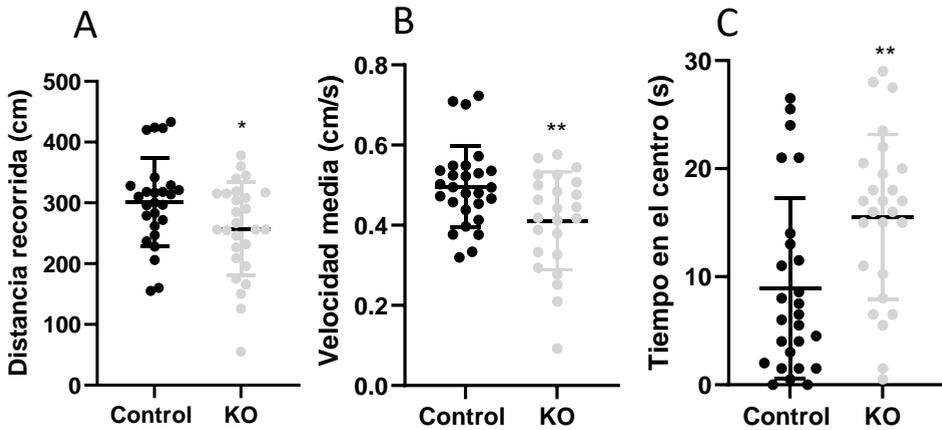


Figura 11. Locomoción. La figura 11A muestra la distancia recorrida, la figura B la velocidad media. Finalmente el tiempo en el centro de la arena aparece representado en la figura 11C. Se aplicó la prueba t de student en A y B y Mann Whitney en caso C (*p-valor < 0,005; **p-valor < 0,001). Cada punto es una mosca.

El resultado obtenido sobre el tiempo en el centro de la arena (Figura 10C) mostró que a pesar de caminar menos y más lento, las moscas KO invirtieron más tiempo en el centro de la arena que las controles. Este comportamiento, al igual que en ratones, es sinónimo de ansiedad en los animales (Mohammad et al., 2016). Por tanto las moscas KO no solo reprodujeron fenotipos físicos de la enfermedad si no también psicológicos.

Aprendizaje y memoria a corto plazo

Para llevar a cabo este ensayo se tuvo en cuenta la fototaxis que tienen las moscas, es decir, su tendencia a moverse hacia la luz. Combinando está dentro de un laberinto con un estímulo negativo se midieron su capacidad de aprendizaje y memoria a corto plazo (Seugnet et al., 2009). Para llevar a cabo el ensayo las moscas se introdujeron dentro de una cámara oscura conectada con una cámara iluminada. Cuando estas se dirigen hacia la cámara iluminada instintivamente, encontraban un papel de filtro empapado en quinina, la cual tiene un sabor amargo y actúa como repelente (Figura 45). Tras un

entrenamiento previo se hizo el ensayo inmediatamente después, cuantificando así su capacidad de aprendizaje. Repitiéndolo al cabo de 5 horas se cuantificó también la memoria a corto plazo.

En la Figura 12 se muestran los resultados obtenidos. Comparando la capacidad de aprendizaje, es decir, la diferencia entre P0 del control y P0 del genotipo KO se puede ver en el caso de las primeras, un 40% evita la luz mientras que las KO no alcanzan el 20%. Cuando se compara P0 y P5 se puede ver una caída en el porcentaje de moscas que recuerdan lo aprendido tanto las controles como las "knock-out". Este descenso sigue la misma tendencia en ambos genotipos, y las diferencias entre P5 control y P5 KO son las que ya había a P0. Por tanto, se puede concluir que el KO muestra una disminución en la capacidad de aprendizaje, pero no en la memoria a corto plazo.

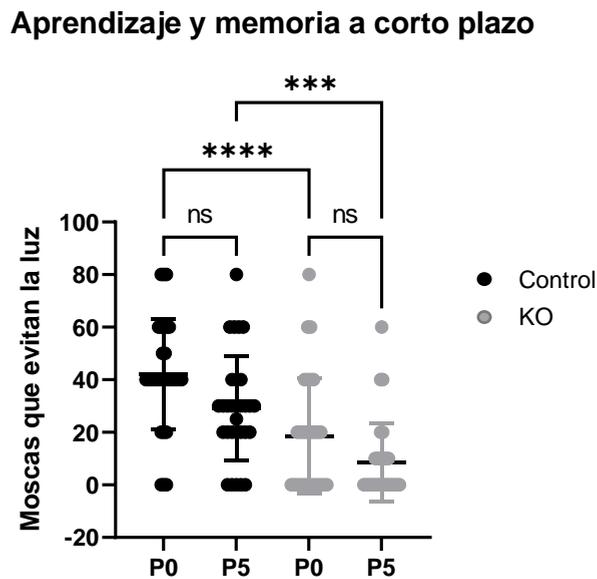


Figura 12 Aprendizaje y memoria a corto plazo. Se aplicó el test ANOVA unidireccional (***)p-valor < 0,0001). Cada punto se corresponde a una mosca.

Tratamiento de las crisis con imanes

Estudios previos con imanes mostraron una reducción de la actividad neuronal asociada a la epilepsia en modelos de crisis inducidas por fármacos (Rivadulla et al., 2018). Debido a la interacción con dicho grupo de investigación a través de la red de investigación para el síndrome de Dravet denominada Indre, se estableció contacto con los autores para testar dicha terapia en el modelo *para*^{KO}. Para probar esta terapia en el modelo generado, se sumergieron las moscas en el baño caliente sobre el imán y otra pieza idéntica con la misma aleación, pero no imantada. Más tarde se cuantificó la cantidad, duración y aparición de las crisis (Figura 13). Los resultados en el imán mostraron una disminución en el número de moscas que las padecen, su duración (no significativo), y la aparición tardía de las mismas. Cabe destacar que los controles no entraron en crisis en ninguno de los dos materiales. También se observó que la polaridad del imán no afectaba al resultado obtenido.

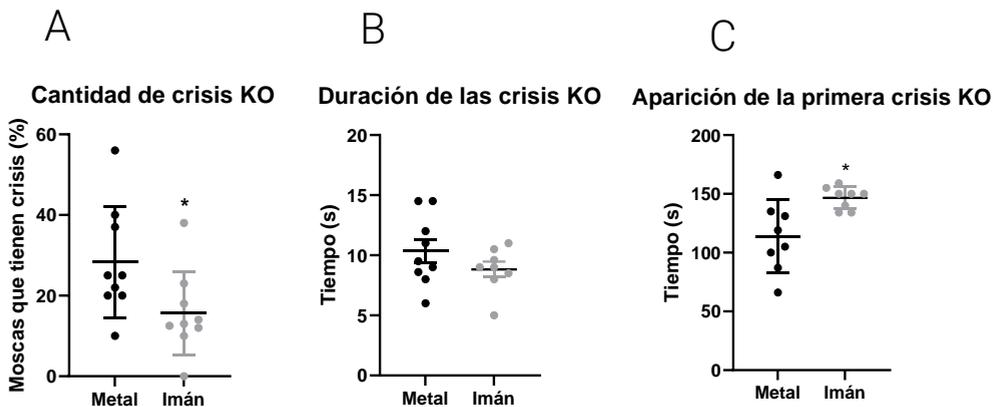


Figura 13. Cantidad, duración y aparición de las crisis tras el uso de imanes. Figura 13A: cantidad de crisis. Figura 13B: duración de las crisis. Figura 13C: aparición primera crisis. Cada punto es un tubo de 10-15 moscas. Se aplicó la prueba t de student (*p-valor < 0,005).

Supervivencia en ayuno

Durante la realización de experimentos para evaluar el aprendizaje de las moscas a través de métodos de aversión fototáctica estas debían ayunar. Haciendo pruebas para optimizar el tiempo de ayuno se observó diferencias en la supervivencia de ambos genotipos en tras 40 horas sin comida (Figura 14). Mientras que las moscas control sobrevivieron en su gran mayoría, el 90% aproximadamente, en las KO sucedió todo lo contrario, teniendo una mortalidad cercana al 70%. Los cambios en la dieta y por tanto el metabolismo han conseguido revertir los síntomas en diferentes modelos de epilepsia en *Drosophila melanogaster*, (Kasuya et al., 2019; Fogle et al., 2019; Radlicz et al., 2019). Con el fin de estudiar las diferencias metabólicas entre las moscas KO y los controles se hicieron experimentos de metabólica.

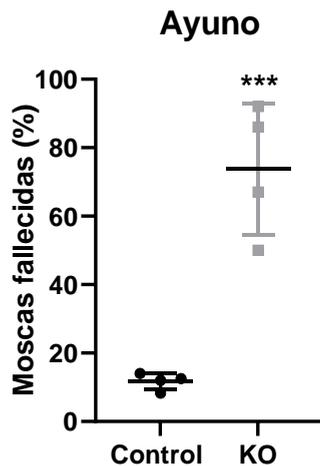


Figura 14. Supervivencia al ayuno tras 40 horas. Cada punto es un tubo de 10-15 moscas. Se aplicó la prueba t de student (***)p-valor < 0,0001).

Metabólica

En el síndrome de Dravet y en otros síndromes epilépticos, las crisis son capaces de provocar daño del tejido neuronal a través del estrés oxidativo, la inflamación y el desequilibrio metabólico. Las muestras de RMN (resonancia magnética nuclear) de pacientes pediátricos de epilepsias resistentes a fármacos revelaron alteraciones en metabolitos relacionados con la inflamación y el estrés oxidativo (Pearson-Smith & Patel, 2017). Esto se tradujo en incrementos de N-acetil-glicoproteínas, lactato, creatina, glicina y lípidos o disminuciones de citrato. Se ha propuesto el uso de estos metabolitos como biomarcadores para el estudio de la progresión de la patología y la evaluación del efecto de las intervenciones farmacológicas (Boguszewicz et al., 2019). Para llevar a cabo estos experimentos se diseccionaron las cabezas de moscas *para*^{KO} y controles por su riqueza en sistema nervioso central. El primer análisis que se hizo fue el de componentes principales (PCA) (Figura 15).

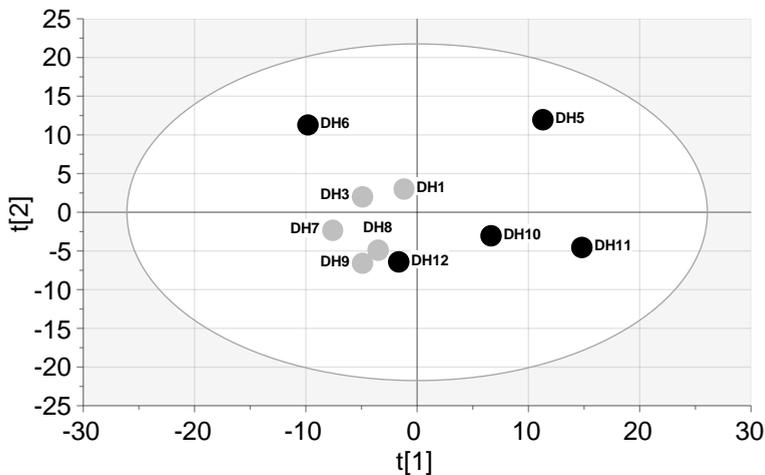


Figura 15. PCA de los espectros de RMN provenientes de los extractos de la fase acuosa de cabezas. Las muestras DH2 y DH4 fueron excluidas. Escala UV. R2X (suma) = 74, Q2 (suma) = 0,31. Modelo de 3 componentes. Cada punto representa el metabolismo de 15 moscas.

Como se puede observar en la Figura 15, la componente 1 separa bastante bien los genotipos, aunque la muestra 6 del control se aleja del resto de su grupo. También cabe destacar que en general las muestras KO tienen menos variabilidad. Después de esto se procedió a analizar los diferentes metabolitos de manera independiente.

Metabolitos fase acuosa

Analizando algunos de los metabolitos de la fase acuosa se pudo observar una acumulación de aa en el genotipo KO (Figura 16). La relación entre epilepsia y el aumento de aa en distintas muestras de pacientes de epilepsia y crisis es algo ya descrito (Honda, 1984; During & Spencer, 1993). Recientemente durante el estudio de epilepsias farmacorresistentes se describió que el aumento de algunos aa esenciales (valina, leucina e isoleucina) podría ser debido a defectos en la oxidación mitocondrial (Boguszewicz et al., 2019).

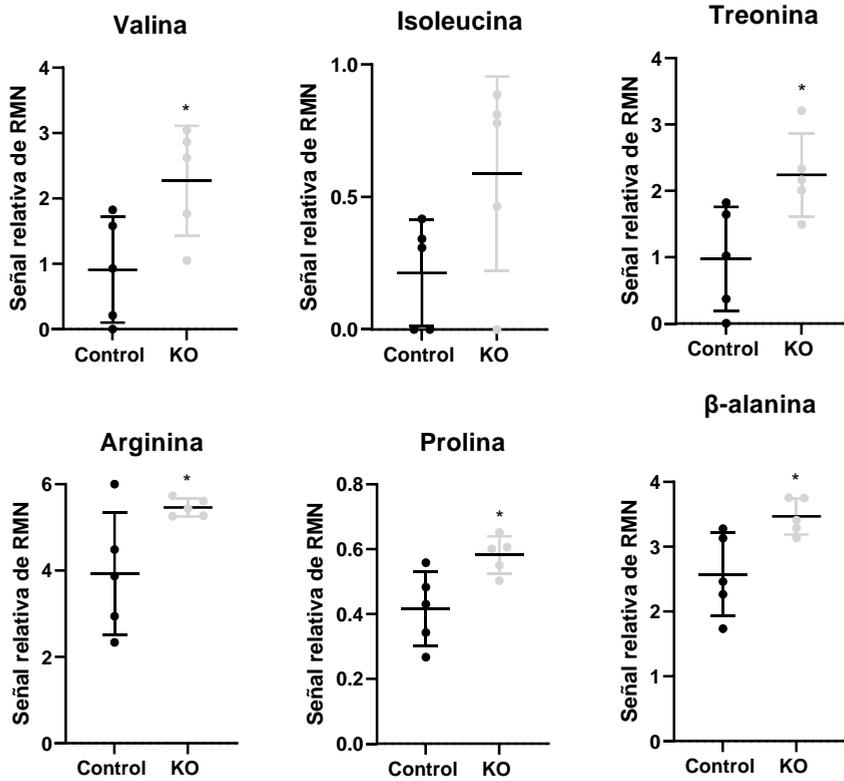


Figura 16. Diferencias metabólicas de aminoácidos. La abundancia relativa se calculó como la concentración normalizada al área total del espectro. Para comparar entre ambos grupos Se aplicó la prueba t de student (*p-valor < 0,005). Cada punto representa el metabolismo de 15-20 moscas.

Estudiando algunos metabolitos del ciclo de Krebs se vio también un aumento en la cantidad de lactato y succinato (Figura 17). El incremento en lactato también se ha descrito como indicativo de defectos en la función mitocondrial (Boguszewicz et al., 2019). Niveles elevados de succinato se han relacionado con estrés mitocondrial en modelos de síndrome de Dravet en pez cebra (Kumar et al., 2016).

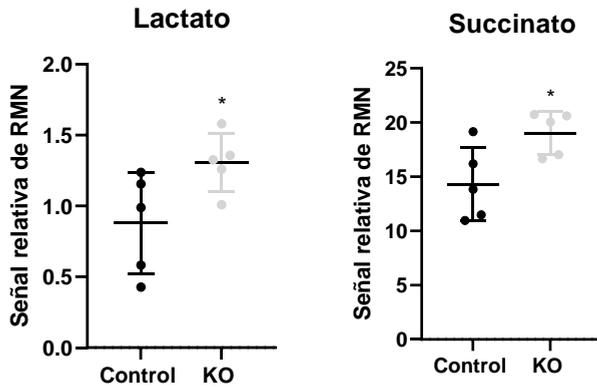


Figura 17. Diferencias metabólicas de en lactato y succinato. La abundancia relativa se calculó como la concentración normalizada al área total del espectro. Para comparar entre ambos grupos Se aplicó la prueba t de student (*p-valor < 0,005) Cada punto representa el metabolismo de 15-20 moscas.

Otro metabolito cuyos cambios resultaron interesantes fue el GABA. El genotipo KO mostró niveles más altos, esto podría ser debido a la fabricación, pero falta de liberación del mismo, lo cual en última instancia causaría su acumulación.

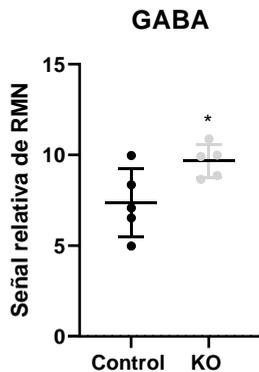


Figura 18 Diferencias metabólicas de GABA. La abundancia relativa se calculó como la concentración normalizada al área total del espectro. Para comparar entre ambos grupos Se aplicó la prueba t de student (*p-valor < 0,005). Cada punto representa el metabolismo de 15-20 moscas.

Metabolitos fase orgánica

Se repitió el análisis de componentes principales en el caso de la fase orgánica (Figura 19), de nuevo la componente 1 separó bastante bien los genotipos, aunque la muestra 11 del control se alejó del resto de su grupo. En este caso fueron las muestras control las que se agruparon más uniformemente.

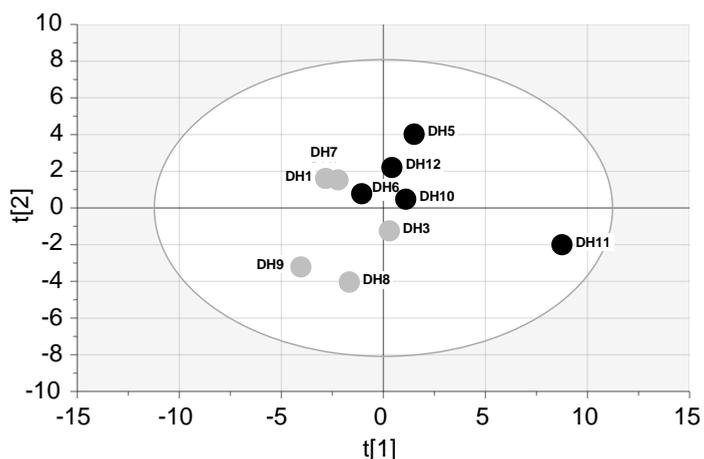


Figura 19. PCA de los espectros de RMN provenientes de los extractos de la fase orgánica de cabezas. Las muestras DH2 y DH4 fueron excluidas. Escala UV. R2X (suma) = 73, Q2 (suma) = 0,28. Modelo de 2 componentes. Cada punto representa el metabolismo de 15-20 moscas.

El análisis más en detalle de los metabolitos de la fase orgánica mostró una disminución en fosfolípidos, glicerol y ésteres grasos en el genotipo KO, y un aumento de triglicéridos y cadenas lipídicas (Figura 20). Relacionar estas alteraciones con procesos biológicos concretos es más complejo puesto que su análisis implica el estudio de grupos funcionales, pero no de metabolitos concretos.

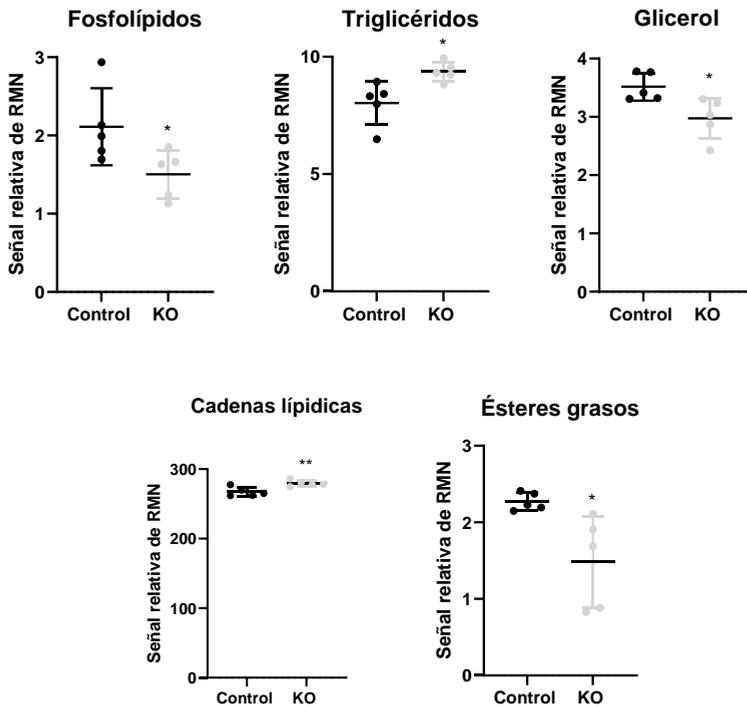


Figura 20. Diferencias metabólicas en los metabolitos de la fase orgánica. La abundancia relativa se calculó como la concentración normalizada al área total del espectro. Para comparar entre ambos grupos Se aplicó la prueba t de student (**p-valor<0.001,*p-valor<0.05). Cada punto representa el metabolismo de 15-20 moscas.

La síntesis de los fosfolípidos que constituyen la membrana es un proceso altamente demandante a nivel energético, por lo que la disfunción mitocondrial anteriormente teorizada podría estar afectando a este proceso (Turker et al., 2014). Del mismo modo, la falta de liberación de GABA podría estar afectando a otros lípidos que componen la membrana debido a que sus receptores se sitúan en la misma (Cole-Edwards & Bazan., 2005). Algunos fármacos antiepilépticos están dirigidos a la estabilización de la membrana con el fin de aumentar la transmisión gabaérgica (Hammond et al., 1984).

Generación modelo “*knock-in*”

Tras la validación y caracterización del mutante *para*^{ko} se intentó generar un modelo “*knock-in*” introduciendo el ADNc del gen humano *SCN1A* en el sitio attP ya insertado en el genoma de la mosca a través del vector pTV cherry. Para ello se obtuvo un ADNc humano clonado en pcDNA3 que se subclonó a su vez en el vector RIV^{white}. Tras el análisis de la secuenciación se comprobó que había adquirido una inserción de un transposón. Este se intentó eliminar empleando diferentes técnicas de clonación avanzada como el ensamblaje Gibson o “*In-Fusion*” sin grandes resultados. Finalmente se compró el fragmento sintetizado del gen *SCN1A* que se había visto comprometido por el transposón y se intentó clonar con métodos convencionales para restaurar la secuencia original eliminando la del transposón pero a pesar de todos los intentos tampoco funcionó.

Discusión

Los resultados obtenidos sobre la pérdida de función del gen *para* tras la escisión del primer exón con la técnica de la recombinación homóloga validaron el diseño experimental empleado. Los mutantes homocigotos no fueron viables debido a que *para* es el único gen implicado en la regulación de los canales de sodio en *Drosophila melanogaster* y su función es esencial para el mantenimiento de la homeostasis del organismo. Los mutantes heterocigotos no alcanzaron el 50% del transcrito que habría cabido esperar, algún sistema de autorregulación celular podría estar detrás de este resultado.

La caracterización de los modelos heterocigotos empezó por el fenotipo epiléptico. Para ello, las moscas se sometieron a un estímulo térmico tras sumergirse en agua caliente. Se comprobó que cerca del 80% de las moscas tenían crisis y que estas aparecían apenas inmediatamente y aumentaban de manera exponencial con el paso del tiempo. En otros modelos del síndrome de Dravet en *Drosophila* generados a través de mutaciones de pérdida de sentido o “*missense*” equivalentes entre pacientes y moscas, el porcentaje de moscas heterocigotas que entra en crisis es cercano al 50% (R. J. Schutte et al., 2014), lo cual indicaría que la escisión del gen sería tendría consecuencias más graves en este tipo de fenotipo. Debido a que el estatus epiléptico o las crisis incontroladas de larga duración son un problema grave entre los pacientes de síndrome de Dravet, se diseñó un ensayo en el que se imitó este tipo de estímulo. La baja supervivencia de las moscas KO *para* tras el mismo fue un resultado muy interesante debido a que actualmente la gran mayoría de modelos existentes son químicos y no genéticos (Nirwan et al., 2018). Las pocas ocasiones en las que impredeciblemente los ratones padecen este tipo de crisis, son automáticamente descartados de los estudios porque mueren y no se pueden comparar al resto (Ricobaraza et al., 2019; Kalume et al., 2013). Este hallazgo abre la puerta al diseño de experimentos en mamíferos superiores en lo que también se pueda controlar este tipo de fenómenos. Del mismo modo, la posible conservación de este proceso biológico en

la mosca de la fruta también abre un campo de estudio para conocer más a fondo los mecanismos implicados, y sus posibles tratamientos.

Tras conocer que las moscas exhibían uno de los fenotipos más característicos de la enfermedad como son las crisis, se estudiaron otros como los problemas musculares. Para ello se llevaron a cabo los ensayos de geotaxis negativa, vuelo y locomoción en la arena. Los resultados obtenidos dejaron entrever dificultades en todos los movimientos en los mutantes KO. Además, en el caso de la arena también se pudo analizar la ansiedad, la cual resultó ser superior en las moscas *para*^{KO}. Algunos de los tratamientos actuales en pacientes son fármacos también recomendados para tratar este problema psicológico (Cross et al., 2019). Finalmente también se observó que las moscas KO tenían menor capacidad de aprendizaje pero no memoria a corto plazo que sus hermanas controles. Gran parte de estos fenotipos se han descrito en otros modelos del síndrome de Dravet como pez cebra y ratón y validan el modelo generado en *Drosophila melanogaster* como modelo de la patología (Tiraboschi et al., 2020; Griffin et al., 2018). Su estudio puede ayudar a conocer más detalle la enfermedad, sus implicaciones y tratamientos.

Finalmente también se probó una terapia con imanes ya testada en modelos mamíferos de epilepsia inducida farmacológicamente (Rivadulla et al., 2018). Como resultado se obtuvo una disminución en el porcentaje de moscas que tenían crisis, menor duración de las mismas, y una aparición más tardía. Esto no solo demostraría la similitud entre el mecanismo de acción de las crisis en animales inferiores y superiores, también abre la puerta como terapia del síndrome de Dravet en el futuro.

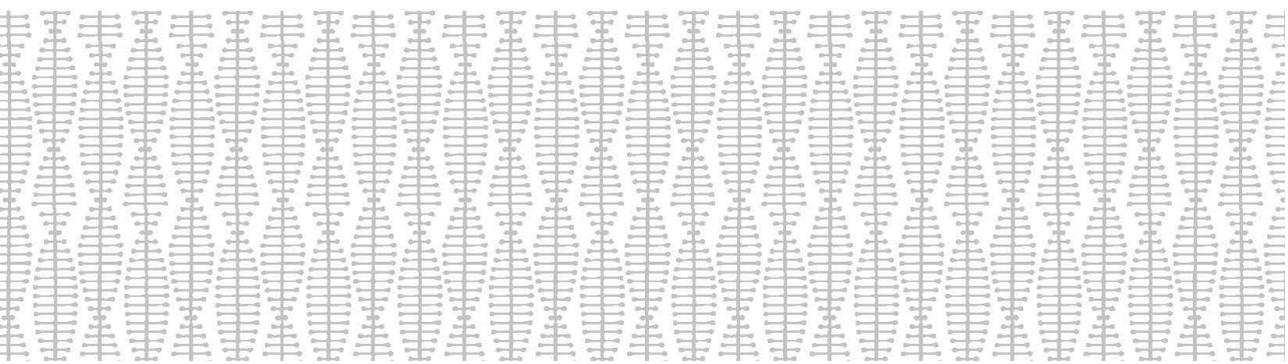
A raíz de observar una menor supervivencia asociada al ayuno en el genotipo KO, y las posibles implicaciones del metabolismo en la epilepsia, se diseccionaron las cabezas de los modelos generados y se procedió a realizar un estudio metabolómico a través de RMN. Los modelos PCA de la fase acuosa y orgánica mostraron diferencias metabólicas entre ambos genotipos. Los aumentos de aa, lactato y succinato observados en el mutante podrían estar relacionado con el fenotipo epiléptico y una

consecuente disfunción metabólica mitocondrial. La relación entre estrés oxidativo, neuroinflamación, hiperexcitabilidad y epilepsias como el síndrome de Dravet está ampliamente descrita (Espinós et al., 2020). La dieta cetogenica ha resultado disminuir este aumento en la concentración de aa en los mutantes puesto que implica una reducción en el aporte de proteínas y un menor estrés oxidativo. El mecanismo de acción de algunos fármacos como el cannabidiol para el tratamiento de la enfermedad han mostrado abordar el metabolismo asociado a la misma (Perry et al., 2020). La acumulación de GABA podría ser debida a la pérdida de excitabilidad de las células y por tanto su incapacidad de generar potenciales de acción, lo cual dificultaría la liberación y reabsorción de dicho neurotransmisor. La disminución en la cantidad de fosfolípidos también podría estar relacionada con la incapacidad energética ya mencionada. Las alteraciones en el resto de lípidos pueden ser debidas a una reorganización de la membrana donde se encontrarían los receptores de GABA. En células de hipocampo de modelos de ratón del síndrome de Dravet se han observado alteraciones metabólicas en diferentes intermediarios del ciclo de la glucólisis, del ácido tricarboxílico y de glutamato/ácido γ -aminobutírico. Todos estos cambios energéticos pueden comprometer la función neuronal y por tanto contribuir a la susceptibilidad a las convulsiones (Miljanovic et al., 2021).

En conjunto los cambios observados en el mutante validan el modelo de la enfermedad y abren nuevas vías de estudio tanto para entender el mecanismo fisiopatológico de la patología y encontrar biomarcadores, como para desde un punto de vista más práctico, usar dichas alteraciones como dianas terapéuticas.

Capítulo II

Análisis funcional de los canales de sodio en el
mutante *para*^{KO}



Introducción

Electrofisiología de las neuronas

El proceso fisiológico de la excitabilidad eléctrica y las moléculas que lo median son similares entre humanos y *Drosophila melanogaster*. En ambos casos la transmisión sináptica excitadora está regulada por canales activados por ligando, principalmente receptores de acetilcolina y glutamato. Dicha conservación también tiene lugar en el proceso opuesto, la inhibición, siendo los receptores en este caso de GABA. El papel de los canales de calcio también es importante en ambos organismos para la liberación de los neurotransmisores. Finalmente los sofisticados canales de sodio juegan un papel fundamental transportando las corrientes iónicas que fluyen hacia las células nerviosas y provocan en última instancia la activación del potencial de acción y su viaje a través los axones (R. Kroll, A. Saras, 2017; Frank et al., 2013).

Desde un punto de vista eléctrico la célula se comporta como un capacitador, es decir, un dispositivo que almacena cargas a dos lados (fluidos intra-extracelular) de un aislante (la membrana). Por eso mismo la célula tiene una diferencia de potencial (V) concreto y sus cambios disparan los potenciales de acción. El potencial de membrana no es más que el voltaje a través de la misma, es decir la diferencia de concentración de los iones a un lado y otro. La intensidad de la corriente (I) es la medida del flujo de estos iones. La conductancia (C) es la facilidad para desplazarse de las cargas y la resistencia eléctrica (R) es lo contrario, la oposición de un conductor al flujo de cargas a través. La ecuación que aparece a continuación es la ley de Ohm y es la que relaciona todos estos conceptos

$$V = I/R$$

El voltaje se mide en voltios (V), la resistencia en ohmios (Ω) y la corriente en amperios (A).

En humanos y en *Drosophila melanogaster* cuando una neurona recibe un estímulo los canales de sodio se abren y este entra a favor de gradiente de concentración. Entonces los canales pasan de estar desactivados y cerrados a activados y abiertos. Cuando esta apertura finaliza comienza el proceso de inactivación, en el cual el canal permanece abierto, pero en un estado de no conducción iónica, por lo que en términos prácticos está cerrado. Las corrientes transitorias (Na_T) son las que indican el pico de apertura del canal mientras que las persistentes (Na_P) representan la inactivación de las mismas, durante la cual puede haber parte de canales que permanezcan abiertos o sean susceptibles de volver a abrirse (Stafstrom, 2007; Kahlig et al., 2006). Estas corrientes juegan un papel esencial en la regulación de la excitabilidad de la membrana, y las mutaciones que afectan a su función, provocan epilepsia (Figura 21) (Stafstrom, 2007; Yue et al., 2005).

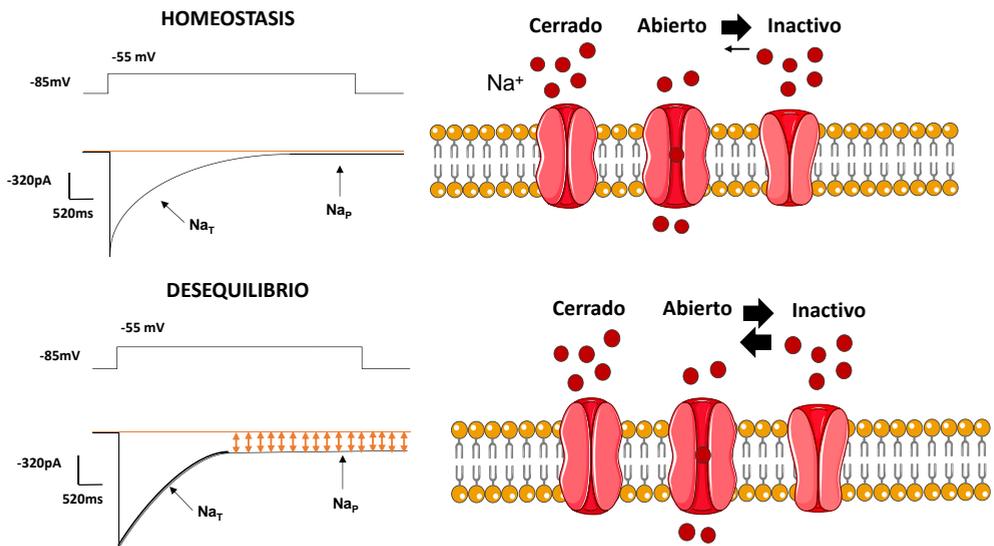


Figura 21. Corrientes de sodio y conformación del canal en situaciones de homeostasis y disequilibrio. Se aprecia como en la homeostasis la amplitud de las corrientes persistentes es mucho menor que en el estado de disequilibrio, así como la facilidad del paso de los canales del estado abierto a inactivo.

La electrofisiología en *Drosophila melanogaster*

La baja cantidad de neuronas de *Drosophila melanogaster* y su simple trazabilidad genética hacen que la identificación por localización, fisiología, morfología, expresión génica y linaje sea mucho más simple que en organismos superiores. Esto facilita el estudio del rol de todas y cada una de ellas en la generación de comportamientos (Kazama, 2015). Los métodos de electrofisiología para provocar crisis y registrar la actividad eléctrica posterior están altamente establecidos en el modelo de mosca de la fruta. Para provocar la actividad eléctrica similar a una convulsión se emplea una estimulación de alta frecuencia (HFS) dando pulsos de 0,4ms a 200Hz durante 300ms. Este estímulo se provoca directamente en el cerebro y se registra en los músculos del vuelo torácicos, de modo que dicha actividad similar a una convulsión refleja los potenciales de acción de las motoneuronas uno a uno. Las convulsiones son extensas y abarcan al menos 14 músculos diferentes, los cuales a su vez contienen 60 fibras musculares inervadas por 58 motoneuronas. Las crisis suceden en un todo o nada, los estímulos HFS por debajo de un voltaje umbral nunca provocan convulsiones, mientras que justo por encima, siempre las desencadenan. Este umbral es similar para todos los individuos de un genotipo determinado, y por tanto puede servir para clasificar a diferentes mutantes en base a su susceptibilidad a las crisis (L. Parker, Howlett, et al., 2011).

La cepa *para*^{bss1} ha sido caracterizada con un umbral de susceptibilidad a crisis de 3.2V y el análisis posterior de sus corrientes persistentes mostró mayor amplitud que la de sus homólogos controles. Esto se relacionó directamente con el aumento en la frecuencia de los potenciales de acción en este genotipo. Los cambios en estas corrientes también se relacionaron con un modelo del síndrome de Dravet en *Drosophila melanogaster* denominado *para*^{DS}. Este fenómeno se ha reproducido en humanos y otros modelos animales y su reversión ha servido como tratamiento de las crisis epilépticas.

Algunas de las técnicas empleadas para analizar las corrientes de iones como el sodio y la excitabilidad de la membrana se denominan experimentos de pinzas de voltaje y de corriente o en inglés: "*voltaje y current clamp*". A través de ellas se imita de manera artificial y controlada lo que sucede en un entorno biológico natural. En el experimento de pinzas de voltaje se controla el voltaje de la membrana y mide la corriente transmembrana requerida para mantener ese voltaje. Las corrientes que fluyen son proporcionales a la conductancia de membrana, es decir, al número de canales abiertos. Por el contrario, en los experimentos de pinzas de corriente se aplica corriente y se observa los cambios en el potencial de membrana, imitando así los potenciales de acción.

El protocolo experimental (Marley & Baines, 2011) consiste en la disección del sistema nervioso de larvas de tercer estadio y su posterior fijación con pegamento quirúrgico (Figura 22A). A continuación con ayuda del microscopio y el micromanipulador, se accede a las neuronas empleando un electrodo de lisis que rompe el neurolema (Figura 22A). Finalmente con un electrodo de parche o "*patch*" se atrapa la célula, se abre y se miden las corrientes anteriormente mencionadas (Figura 22B). En este trabajo se pincharon las motoneuronas denominadas aCC debido a su similitud con las interneuronas humanas, ya ambas comparten las alteraciones en las corrientes de sodio que correlacionan con el fenotipo epiléptico. Además, también son sencillas de manipular tanto genética como electrofisiológicamente (Lin et al., 2017).

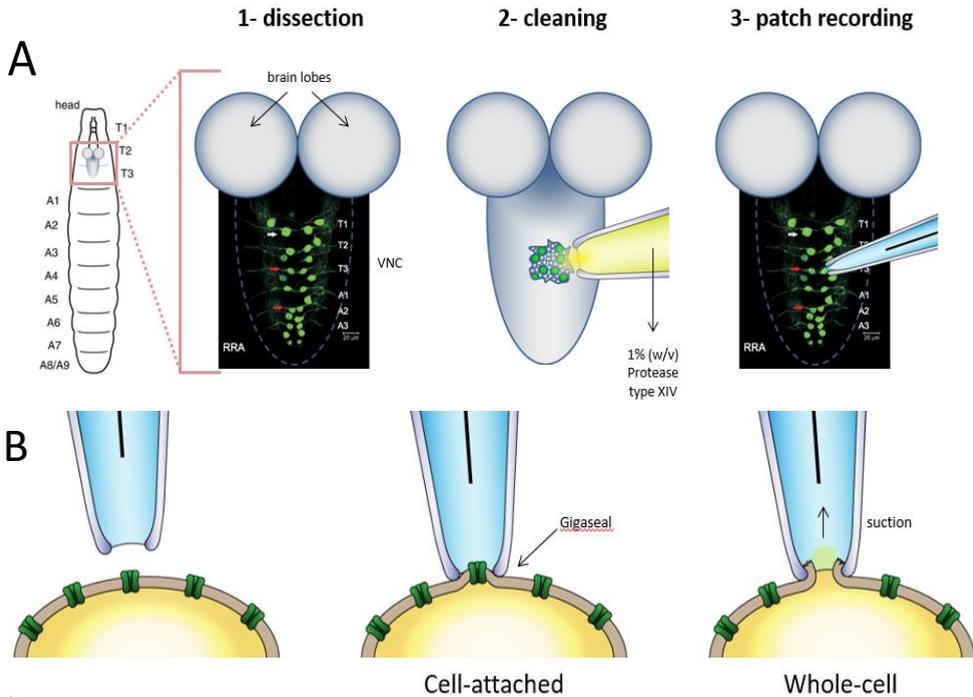


Figura 22. Procedimiento electrofisiología. En la Figura 22A se puede ver las neuronas del cordón nervioso ventral (VNC) fluorescentes. El siguiente paso sería la limpieza con ayuda de proteasa (22B) y finalmente el “patch”. La Figura 1B muestra la unión del electrodo con la célula más en detalle. Esta debe producirse a una resistencia muy elevada para asegurar su estrechez. Estas figuras fueron cedidas por el Dr. Carlo Giachello.

En este capítulo se va a abordar el objetivo 2 de esta tesis doctoral, el análisis de las corrientes de sodio del modelo *para*^{KO} a través de experimentos de electrofisiología.

Resultados

Electroshock

Resultados previos del mutante *para*^{KO} en etapas adultas habían demostrado su fenotipo epiléptico sometido a estímulos térmicos. Con el fin de conocer si las larvas también convulsionaban, las crisis se indujeron a través de estímulos eléctricos. Para ello, con ayuda de una sonda metálica, se aplicó un electroshock de 3s y una potencia de 30v en el sistema nervioso central de las larvas y se estudió su tiempo de recuperación. Cuando el estímulo cesó las larvas se contrajeron tónicamente mostrando espasmos. El tiempo de recuperación se cuantificó a través de la recuperación de su movilidad normal (Figura 23). Se observó que el genotipo KO necesitó más tiempo de recuperación. Estos resultados complementaron las diferencias ya observadas en adultos a través de estímulos térmicos y demostraron que los defectos del mutante se daban desde estadios muy tempranos.

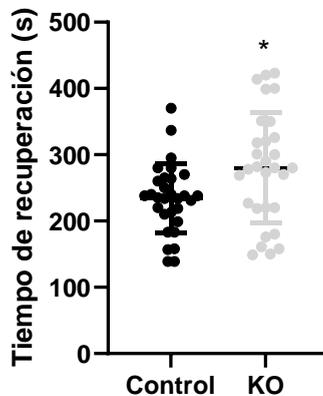


Figura 23. Tiempo de recuperación tras un electroshock. Cada punto es una larva. Se aplicó la prueba t de student. (*p-valor < 0,05).

Capacitancia

El primer resultado que se obtuvo con respecto a la caracterización del KO tras la disección de las larvas fue la observación directa de los defectos morfológicos que provocó la escisión del gen *para* en los mutantes epilépticos. La estructura del sistema nervioso central no estaba tan conservada y además las células eran a priori más pequeñas que las controles (imagen no mostrada). Una manera de estudiar estas diferencias fue a través del cálculo de la capacitancia. Este parámetro se define como la capacidad de una célula para almacenar cargas cuando ocurre una diferencia de potencial. En la Figura 24 se puede apreciar que la capacitancia de los mutantes KO era menor que las de las moscas control, lo cual podría justificar los defectos observados anteriormente mencionados.

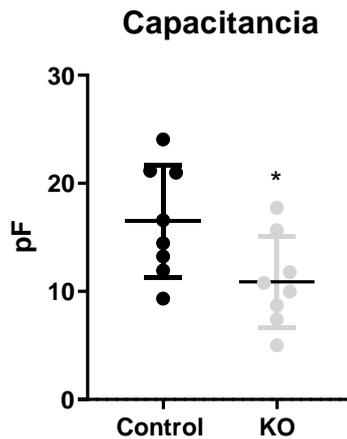


Figura 24. Capacitancia. Se usaron 8 neuronas aCC para cada ensayo de muestras independientes y se aplicó la prueba t de student. (***)p-valor < 0,001).

Corrientes de Na

Con el fin de identificar posibles defectos en las corrientes de sodio, se hicieron experimentos de pinzas de voltaje para analizar las corrientes transitorias y persistentes (Na_T y Na_P respectivamente). Como su nombre indica las corrientes transitorias son breves pero amplias, y son las que provocan la apertura del canal de sodio y por tanto inician la generación de los potenciales de acción. Cuando ya ha entrado suficiente sodio a la célula el poro iónico se bloquea y automáticamente estas corrientes se estabilizan y desaparecen. Por el contrario, las corrientes persistentes representan el estado en el que la mayoría de canales de sodio están cerrados, pero algunos permanecen inactivos y otros incluso son capaces de reabrirse. Esa corriente es menor en amplitud pero mayor en duración. El primer experimento que se hizo para estudiar las corrientes de sodio consistió en un programa denominado "one step" o de un paso, en el cual se cuantificó la amplitud de las corrientes transitorias, persistentes y su ratio (Figura 25).

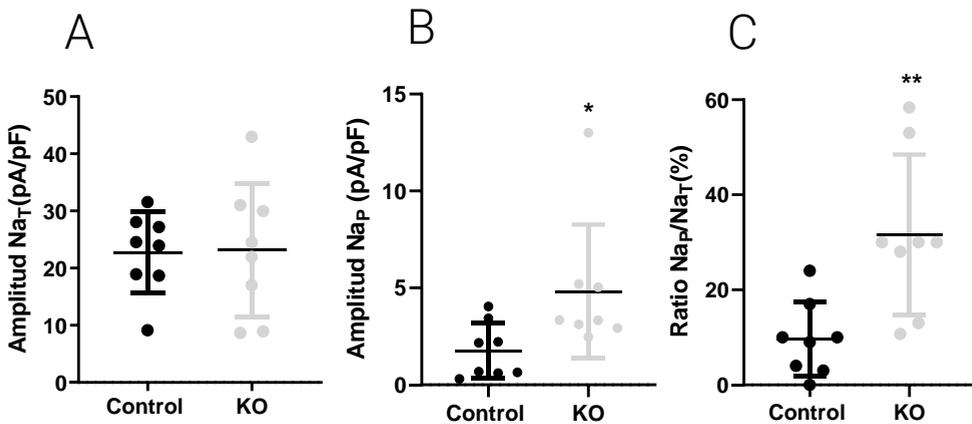


Figura 25. Medida de las corrientes de Na con el protocolo de un paso. Las figuras A y B representan la amplitud de las corrientes transitorias y persistentes respectivamente. La figura C representa el ratio entre ambas. Se usaron 8 neuronas aCC para cada ensayo de muestras independientes. En A se aplicó la prueba t de student. En B y C se hizo Mann Whitney test (*p-valor<0,05; **p-valor<0,01).

Como se puede ver en la Figura 25 las corrientes del Na_T no mostraron diferencias entre el KO y el control. En cambio, en lo que respecta tanto a las Na_P como al ratio P:T se puede ver un aumento significativo en el genotipo *para "knock out"*. Incrementos en las en estos dos parámetros se relacionan estrechamente con el fenotipo epiléptico en DM y humanos, y su uso como diana terapéutica está ampliamente extendido (Lin et al., 2015; Marley & Baines, 2011; Stafstrom, 2007).

Para estudiar más en detalle la cinética de los canales, además de su amplitud a un potencial de membrana fijo, se estudió la relación con el voltaje de cada una de las corrientes, Na_T (Figura 26), Na_P (Figura 27).

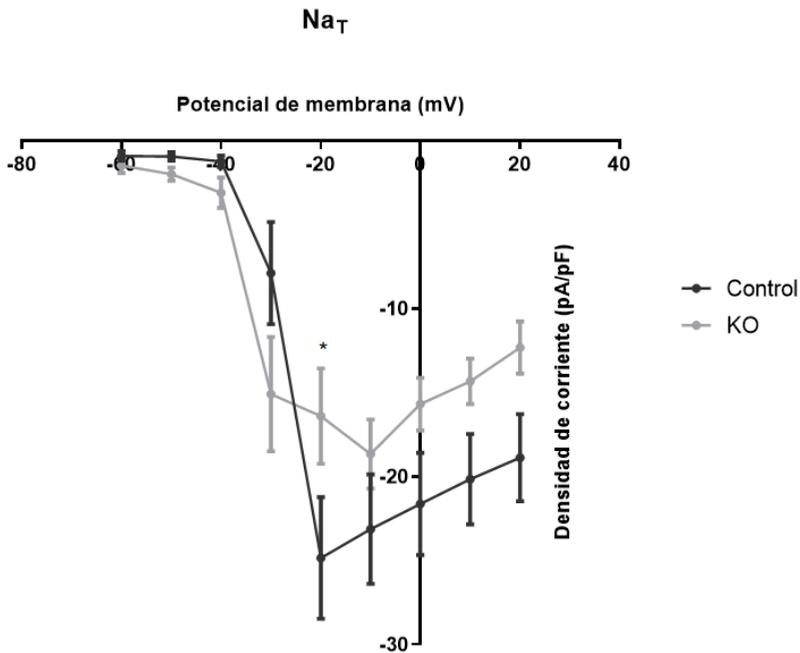


Figura 26. Na_T aisladas. Se aplicó la prueba ANOVA y se usaron 8 neuronas aCC para cada ensayo de muestras independientes (*p-valor < 0,05).

En el caso de las corrientes transitorias (Figura 26) el descenso en las líneas indicó la entrada del sodio en las células, lo cual sucedió a potenciales de membrana y densidades de corriente similares en ambos genotipos. Sin embargo, cuando la densidad de corriente de sodio alcanzó su máximo en el genotipo control, a un

potencial de membrana de -20mV, el KO estuvo 10 pA/pF aproximadamente por debajo, alcanzando su pico más tarde, a un potencial de membrana de -10. Esto podría indicar una apertura total más tardía en el genotipo KO.

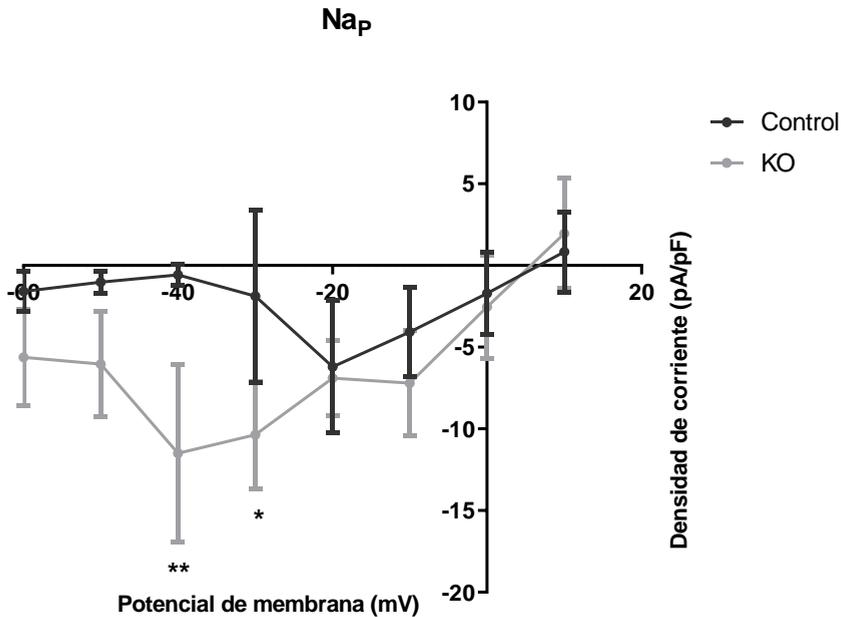


Figura 27. Na_P aisladas. Se aplicó la prueba ANOVA y se usaron 8 neuronas aCC para cada ensayo de muestras independientes (**p-valor < 0,01, *p-valor < 0,05).

Una vez desglosada la señal persistente del sodio (Figura 27) se pudo ver una activación más rápida de estas corrientes en las moscas mutantes. Además, también alcanzaron densidades de corriente mayores, sobre todo a potenciales de membrana de -40 y -30 mV. A -40mV se produce el máximo del KO mientras que en control no sucede hasta -20mV y a densidades de corriente inferiores. Todo esto junto con los datos de la amplitud (Figura 4B) confirmaría no solo una mayor amplitud de corrientes persistentes de sodio, sino también una activación mucho más temprana de las mismas.

Este tipo de corrientes alteradas tanto en pacientes epilépticos como en modelos de *Drosophila melanogaster* para estas enfermedades han demostrado ser también eficientes como dianas terapéuticas (George, 2005; Lin et al., 2017; Rhodes et al., 2004).

Excitabilidad de la membrana

Cuando los iones fluyen a través de la membrana esta cambia continuamente su energía potencial. Si esta despolarización es suficientemente grande puede llegar a producir potenciales de acción que viajan a través de los axones y que este caso caso, por trabajar con motoneuronas, llegan hasta los músculos. Esta propiedad se denomina excitabilidad de la membrana. En la Figura 28 se muestra los resultados obtenidos en este ensayo. Estos datos se obtuvieron tras inyectar corriente a la célula y contar el número de potenciales de acción que acontecen.

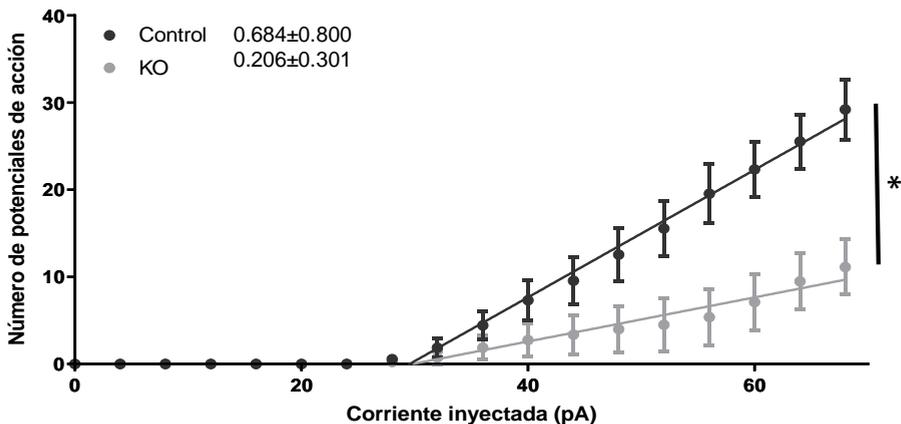


Figura 28. Excitabilidad de la membrana. Se aplicó la prueba ANOVA y se usaron 8 neuronas aCC para cada ensayo de muestras independientes (*p-valor < 0,05). Las cifras al lado de la leyenda de los genotipos indican la pendiente de la curva.

Los resultados mostraron claras diferencias entre el control y el KO (Figura 28). A pesar de que los dos genotipos empezaron a ser reactivos a rangos de corriente inyectada similares (30pA), rápidamente se pudo ver como seguían tendencias distintas. Mientras que el control aumentaba fácilmente el número de potenciales de acción en función de la corriente, no sucedió lo mismo con el KO. A inyecciones de corriente iguales entre ambos, el KO nunca llegó a alcanzar los mismos potenciales de acción que el control, necesitó inyecciones más altas de corriente. Además, el máximo de potenciales de acción que llegó a alcanzar el KO es prácticamente un tercio del control. Acto seguido se estudiaron los potenciales de acción esta vez en función del potencial de membrana (Figura 29).

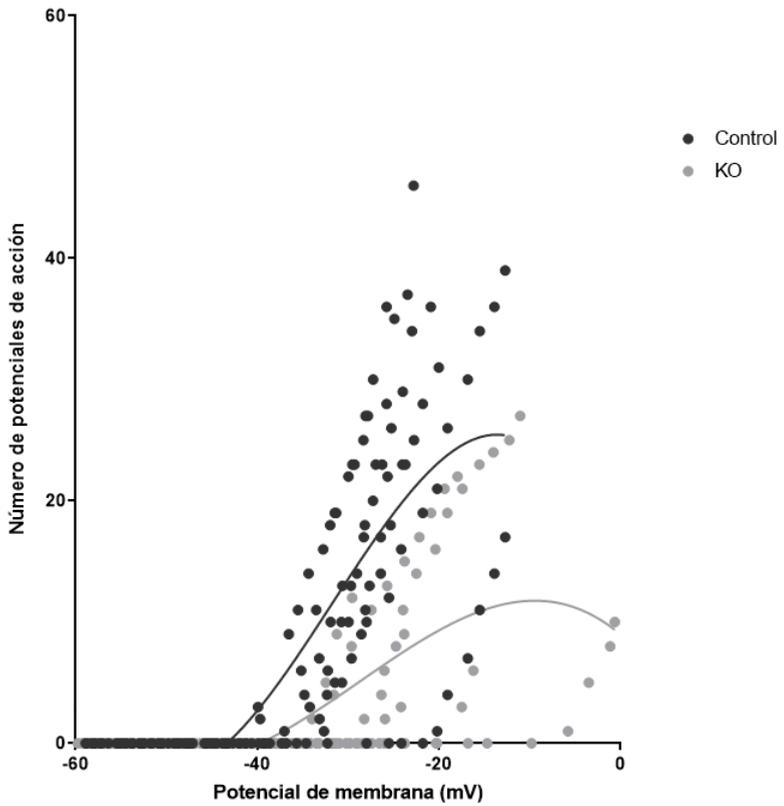


Figura 29. Excitabilidad en función del potencial. Se usaron 8 neuronas aCC para cada ensayo de muestras independientes.

En este caso (Figura 29) se pudo ver resultados muy parecidos a los anteriores. A medida que la membrana se fue despolarizando se produjeron los potenciales de acción y a potenciales de membrana similares los potenciales de acción siempre fueron mayores en el genotipo control alcanzando máximos muy por encima de los del KO.

Análisis de las uniones neuromusculares

Como se ha mencionado anteriormente, las motoneuronas que se han usado en este trabajo para hacer el estudio electrofisiológico son aquellas que inervan los músculos. Para terminar el análisis y ver hasta dónde llegan los efectos de la mutación, se hizo medidas electrofisiológicas en las denominadas NMJ o uniones neuromusculares. Uno de los parámetros que se estudió fue la resistencia, este parámetro biológicamente hablando se puede definir como la impermeabilidad de los canales (Figura 30).

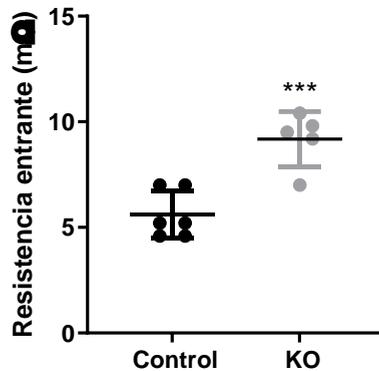


Figura 30. Resistencia NMJ. Se aplicó la prueba t de student. Se usaron 6 neuronas aCC para cada ensayo de muestras independientes (**p-valor < 0,001).

En la Figura 30 se puede ver que la resistencia del mutante es significativamente mayor que la del control, lo que quiere decir que en el KO el flujo de iones es más difícil que en el control. Este resultado demostraría que la afectación no solo es a nivel cerebral, sino que también se extendería a la inervación de estas neuronas con sus músculos, lo cual podría justificar los defectos musculares observados en el primer capítulo.

Discusión

Los primeros resultados de la caracterización general dejaron entrever alteraciones en diferentes funciones básicas del mutante KO. Con el fin de comprender más en profundidad la raíz de estas y teniendo en cuenta que el gen *SCN1A* y *para* producen ambos una proteína esencial en el funcionamiento de los canales de sodio, se pusieron en marcha experimentos de electrofisiología que permitieran el análisis de los mismos.

Uno de los primeros resultados obtenidos comprobó que el tiempo de recuperación de las larvas KO ante estímulos eléctricos fue mayor que en los controles, lo cual probó que los efectos de la escisión del gen tenían sus consecuencias en estadios más tempranos. Por otra parte, los resultados de la capacitancia empezaron a informar acerca del estado de las neuronas más en detalle, las cuales resultaron ser de menor tamaño.

Para estudiar más en profundidad las consecuencias de la escisión del gen se pasó a analizar las corrientes del Na. Las primeras aproximaciones mostraron aumentos en las corrientes persistentes del sodio. Estas corrientes se producen a posteriori de las transitorias, las cuales representan la apertura y cierre de los canales. El cierre de los canales no ocurre de una manera totalmente sincronizada, si no que algunos permanecen abiertos y otros inactivos. Este período en el cual los canales pueden terminar de cerrarse o volver a activarse es la medida de las I_{NaP} . Dichas corrientes regulan la excitabilidad celular, la cual es esencial para el mantenimiento de la estabilidad neuronal. Sus desequilibrios alteran la excitación sináptica y desestabilizan la red de circuitos neuronales conduciendo en última instancia a la epilepsia (Lin & Baines, 2015). Este fenómeno se ha reproducido en modelos animales y su tratamiento ha sido efectivo (Lin et al., 2015; Marley & Baines, 2011; Stafstrom, 2007).

A pesar de que las corrientes transitorias no mostraron diferencias significativas entre ambos genotipos, el ratio Na_P/Na_T si aumentó. Este dato también se ha descrito como indicativo de trastornos epilépticos en otros mutantes de *Drosophila melanogaster* (Lin et al., 2017). Tras el análisis más detallado de cada uno de estos parámetros, se pudo ver que las corrientes transitorias alcanzan su pico de activación más pronto en el control que en el KO. En lo que respecta a las corrientes persistentes, las tendencias fueron opuestas, se activaron antes en el KO.

Los datos obtenidos sobre la excitabilidad de la membrana mostraron menor número de potenciales de acción en el genotipo KO y a potenciales de membrana inferiores que el control. Debido a que los potenciales de acción son los que se encargan de transmitir la señal desde estas neuronas hasta el músculo se hizo registros en el mismo y se pudo ver que la entrada de sodio en ellos estaba comprometida.

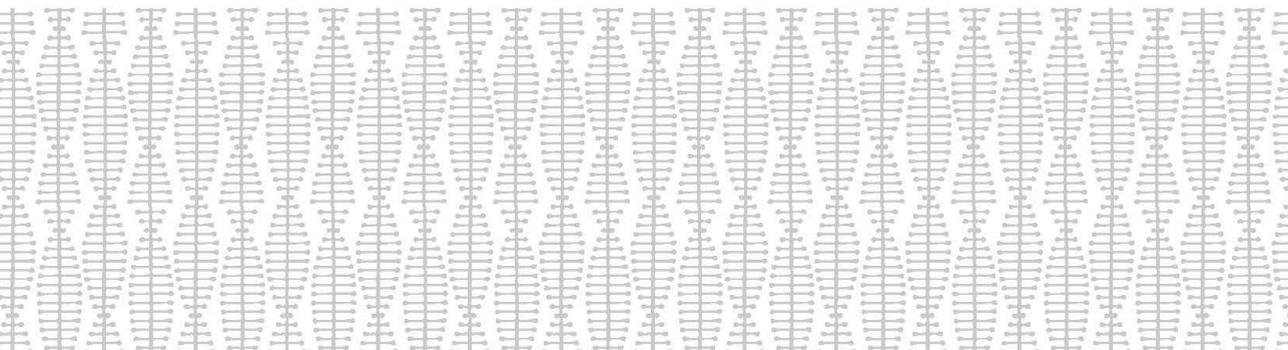
Si bien es cierto que hay cierta controversia por la variabilidad obtenida en múltiples modelos de la enfermedad, parece que el mecanismo patogénico común en las epilepsias derivada de mutaciones en Nav1.1 es la pérdida de función del canal, la cual conduciría a la hipexcitabilidad de cierto tipo de neuronas gabaérgicas situadas en diferentes zonas del cerebro (Mantegazza & Broccoli, 2019). En otros modelos del síndrome de Dravet en *Drosophila melanogaster* las medidas de las corrientes en interneuronas inhibitorias gabaérgicas han mostrado dicha disminución en los potenciales de acción, lo cual se ha llegado a describir como suficiente para la aparición del fenotipo epiléptico (R. J. Schutte et al., 2014). El análisis de las motoneuronas aCC en este trabajo también ha presentado dicha disminución en la excitabilidad y abre un nuevo campo de estudio acerca de su papel en otras comorbilidades como los problemas musculares. Futuras líneas de investigación podrían analizar las neuronas gabaérgicas en el modelo generado junto con otros tipos celulares para elaborar un mapa de la afectación teniendo en cuenta también la localización cerebral. Es muy difícil crear una red neuronal por la importancia del gen *para* en el desarrollo, la cual está poco explorada. También se ha observado gran variabilidad según la aproximación genética y el fondo genético de los modelos

empleados. Una limitación de *Drosophila melanogaster* sería la inexistencia de subunidades beta las cuales también son importantes en la regulación de la función del canal. Otras aproximaciones podrían estudiar también los efectos de la temperatura en los canales.

A pesar de que los experimentos de electrofisiología han resultado muy útiles, no cabe olvidar que los datos se obtienen a través de simulaciones del contexto biológico simplificadas, las cuales intentan reproducir de la manera más fiel posible lo que sucedería en condiciones reales.

Capítulo III

Búsqueda de genes modificadores para el síndrome de Dravet empleando el modelo *para*^{bss1}



Introducción

El papel de los modificadores genéticos en las enfermedades mendelianas y raras

Las enfermedades que siguen un patrón de herencia mendeliano se conocen como patologías mendelianas, este es el caso de aproximadamente el 80% de las enfermedades raras. A pesar de ser monogénicas, más de la mitad de ellas siguen sin tener causa conocida e incluso en los casos en que se conoce el gen responsable de la enfermedad, existe gran variabilidad genotípica. Dicha variabilidad se extiende hasta el punto de pacientes con la misma mutación, lo cual supone grandes desafíos en el diagnóstico y gestión de la evolución de los afectados y afectadas. También se ha dado el caso de analizar datos de genoma y exoma de gente sana donde dichas mutaciones no presentaban síntomas aparentes. Estos estudios de secuenciación del genoma a gran escala proporcionan gran información acerca de la expresividad y penetrancia de las enfermedades raras, así como del potencial efecto de los genes modificadores. La identificación genética del origen de un fenotipo específico puede ser compleja debido a que los genotipos y fenotipos pueden no tener una relación lineal. Esto es debido parcialmente a las interacciones genéticas que juegan un papel crucial en el control de la dependencia funcional entre genes y que puede culminar en una gran variabilidad genotípica (Rahit & Tarailo-Graovac, 2020).

Los genes modificadores podrían ser uno de los factores que explicara la variabilidad clínica en algunos de los casos. Los genes modificadores o modificadores genéticos son aquellos que afectan en la expresión o el fenotipo que causan otros genes, a pesar de que genéticamente segregan de manera independiente. De este modo pueden condicionar una patología en aspectos como su evolución con el paso del tiempo, penetrancia o gravedad. Además, también funcionan como dianas terapéuticas (Kearney, 2011).

***Drosophila melanogaster* como herramienta para la búsqueda de modificadores**

El éxito de *Drosophila melanogaster* como organismo modelo se debe en gran medida al poder los cribados genéticos para identificar los genes que están involucrados en un proceso biológico. La multitud de herramientas y aproximaciones desarrolladas a lo largo de tantos años de investigación ha servido y sigue sirviendo como manera de estudio de múltiples enfermedades (St Johnston, 2002).

Un ejemplo sería este estudio donde recientemente se han descubierto modificadores para el Parkinson. Para ello, emplearon la colección DGRP (panel de referencia genético de *Drosophila melanogaster*), una serie de 205 cepas completamente secuenciadas y genéticamente casi idénticas las unas a las otras. Observaron que el fondo genético afectaba en gran medida al fenotipo locomotor causado por la mutación LRRK2 G2019S. Tras un exhaustivo análisis genético para encontrar los posibles modificadores, se aislaron 19 genes implicados en el crecimiento y la regulación de las proyecciones neuronales. A continuación con la ayuda de la técnica de ARNi (ARN de interferencia) se hicieron pruebas funcionales y descubrieron tres genes que afectaban a la pérdida de neuronas dopaminérgicas asociada a la edad, las cuales causaban en última instancia la disfunción motora del modelo de Parkinson estudiado (Lavoy et al., 2018).

Modificadores genéticos en síndrome de Dravet

El diagnóstico del síndrome de Dravet es un gran paso para muchos pacientes, pero tras el mismo surgen cuestiones relacionadas con el asesoramiento, tratamiento y pronóstico (Cetica et al., 2017). Teóricamente, una parte de la variabilidad fenotípica del síndrome de Dravet se puede asociar a las diferentes variantes patogénicas del *SCN1A*, de modo que las mutaciones que provocan una pérdida de función se asocian virtualmente a fenotipos más severos, mientras que mutaciones que no afectan tanto a la función de la proteína generalmente causan cuadros clínicos más leves (Meng et al., 2015). Sin embargo, una gran cantidad de pacientes muestran una variabilidad a la

que todavía no se ha encontrado explicación. De hecho, hay familias en las que diferentes miembros portan la misma alteración genética, pero pese a ello su sintomatología es de lo más dispar (Passamonti et al., 2015; Suls et al., 2010; Depienne et al., 2010; Depienne et al., 2010; Mahoney et al., 2009; Pineda-Trujillo et al., 2005). Cuando se ha intentado agrupar pacientes con variantes de pérdida de función similares se ha visto que había algunos con grandes discapacidades y otros que en contraposición, eran capaces de vivir vidas mucho más independientes (Akiyama et al., 2010; Harkin et al., 2007; Jansen et al., 2006). Todo esto provoca dificultades a la hora de predecir la evolución de la enfermedad, lo cual es un asunto clave para los padres de los afectados y afectadas.

Algunos de los genes modificadores potenciales ya descritos para la enfermedad son variantes de multitud de genes: SCN9A, SCN8A, SCN2A, HLF, POLG, KCNQ2, CACNB4 y CACNA1G. Algunas de ellas podrían agravar y otras rescatar parte de la clínica (Calhoun et al., 2018; Hammer et al., 2017; Hawkins & Kearney, 2017; Steel et al., 2017; Gaily et al., 2013; Ohmori et al., 2013; Hawkins et al., 2011; Singh et al., 2009). En el modelo KO de ratón se han encontrado “loci” completos como potenciales modificadores. Algunos de los genes candidatos serían subunidades de receptores de GABA, canales, o genes relacionados con crisis o hiperexcitabilidad neuronal (Miller et al., 2014). De hecho, se ha encontrado un enriquecimiento de variantes raras en la excitabilidad neuronal en pacientes graves comparados con leves, sin embargo estos potenciales modificadores identificados solo podrían explicar una pequeña proporción de la variabilidad clínica existente (Hammer et al., 2017).

Modelo *para*^{bss1}

En este trabajo se ha buscado modificadores sobre la mutación *para*^{bss1} de *Drosophila melanogaster*. Esta es una mutación sin sentido en un segmento implicado en la inactivación, denominado "motivo de paleta" del cuarto dominio de homología de NaV. La expresión heteróloga de ADNc que contienen la lesión *bss1* muestra que los canales

mutantes presentan una alteración de la dependencia del voltaje de la inactivación en comparación con el tipo salvaje. Aunque no es ninguna mutación equivalente al síndrome de Dravet en *Drosophila melanogaster*, esta mutación tiene un fenotipo claro y reproducible de crisis epilépticas, comportamiento y electrofisiología, por lo que se emplea para estudio de la misma. Se escogió este modelo porque el modelo *para*^{KO} generado y caracterizado en capítulos anteriores es nulo, y por tanto solo serviría para la búsqueda de modificadores supresores, pero no de intensificadores. Las crisis del modelo *para*^{bss1} presentan una fase tónico-clónica y son las más difíciles de suprimir tanto genética como farmacológicamente hablando (Dare et al., 2021; L. Parker, Padilla, et al., 2011). Las moscas *para*^{bss1} tienen un comportamiento normal hasta que se les provoca un estímulo mecánico también denominado "bang". Este podría ser desde un golpe seco fuerte contra una superficie incluso un vórtex de 10 segundos aproximadamente a máxima potencia (L. Parker, Padilla, et al., 2011). A continuación se muestra una imagen con las diferentes etapas que padecen durante un episodio epiléptico:

En la fase inicial de las crisis agitan las patas y las alas, tras esto se quedan totalmente

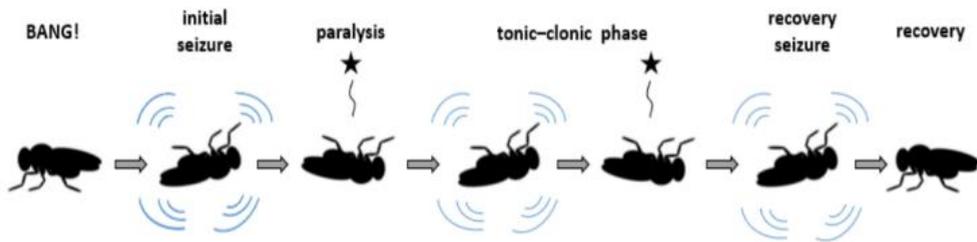


Figura 31. Esquema representativo de las crisis en el modelo *para*^{bss1} de *Drosophila melanogaster*. Estas se definen como espasmos en las patas, seguidas de fallo para mantener la postura, aleteo, y balanceo de abdomen. Imagen adaptada de Parker et al., 2011.

paralizadas y acto seguido en la fase tónico-clónica padecen espasmos incontrolados en diferentes partes del cuerpo acompañados por momentos de inmovilidad. Durante la recuperación también tienen un movimiento incontrolado pero esta vez suele ser más enérgico hasta que terminan levantándose y caminando con normalidad (L. Parker, Padilla, et al., 2011).

En un trabajo de fin de máster previo se llevó a cabo una selección de candidatos a genes modificadores del *SCN1A*. En primer lugar se identificaron genes candidatos en pacientes humanos y posteriormente se escogieron los que estaban conservados en *D. melanogaster* (Ñungo Garzón, 2018).

En este capítulo se van a abordar los objetivos 4 y 5 de esta tesis doctoral, es decir, la búsqueda de modificadores y terapias para el síndrome de Dravet empleando en este caso, el modelo *para*^{bss1}.

Resultados

Preselección y aproximación empleada en la búsqueda de genes modificadores

A partir de los resultados preliminares del trabajo mencionado anteriormente se hizo una preselección de los genes que habían mostrado datos más interesantes y se profundizó en su papel como modificadores (Garzón-Nungo, 2018). En la Tabla 3 se describen los seis genes que se han estudiado a lo largo de este trabajo.

Gen humano	Homólogo en <i>D. melanogaster</i>	Función (UniProt)
<i>CACNA1A</i>	<i>cac</i>	Subunidad α 1A del canal dependiente de voltaje de calcio
<i>CHRNA4</i>	<i>nAChRa4</i>	Subunidad α 4 del receptor de acetilcolina
<i>CHRNB2</i>	<i>nAChRa1</i>	Subunidad β 2 del receptor de acetilcolina
<i>CLCN1</i>	<i>CIC-a</i>	Proteína 1 del canal de voltaje de cloro
<i>KCNQ3</i>	<i>KCNQ</i>	Subfamilia 3 del canal dependiente de voltaje de potasio
<i>PAX6</i>	<i>toy</i>	Factor de transcripción implicado en el desarrollo embrionario

Tabla 3. Genes candidatos a modificadores estudiados a lo largo de este trabajo. Información de la base de datos universal de proteínas UniProt, <http://www.uniprot.org>.

La forma de alterar la expresión de estos genes para comprobar si eran modificadores del *para*^{bss1} fue con el sistema UAS-GAL4 y más concretamente usando la técnica del ARN de interferencia (ARNi), un mecanismo intracelular por el cual se consigue silenciar genes, mediante moléculas de ARN de doble cadena (ARNdc). El sistema UAS-GAL4 es un sistema binario para activar la expresión génica ampliamente utilizado en *Drosophila melanogaster* (Brand & Perrimon, 1993). Consta de la proteína GAL4 (factor de transcripción sensible a galactosa), el cual contiene un dominio de unión a ADN en

su N-terminal y un dominio activación de la transcripción en el C-terminal. Esta proteína se une a una secuencia nucleótido específico, llamada UAS (secuencia de activación aguas arriba), un potenciador que permite la activación de un promotor basal ubicado aguas abajo de la secuencia UAS. Hay líneas de *Drosophila melanogaster* que expresan Gal4 bajo el control de un promotor líneas específicas de tejido y UAS que permiten la expresión de un gen de interés. Cuando estas líneas se cruzan, los descendientes expresan la proteína GAL4, que se une a la secuencia UAS y activa el gen de interés en el tejido para el cual el promotor es específico. En el caso de este trabajo, Gal4 se expresa en tejido neuronal (promotor elav) e introducimos el diferentes ARNi bajo el control de la secuencia UAS provocando así el silenciamiento de los genes de interés (Figura 32).

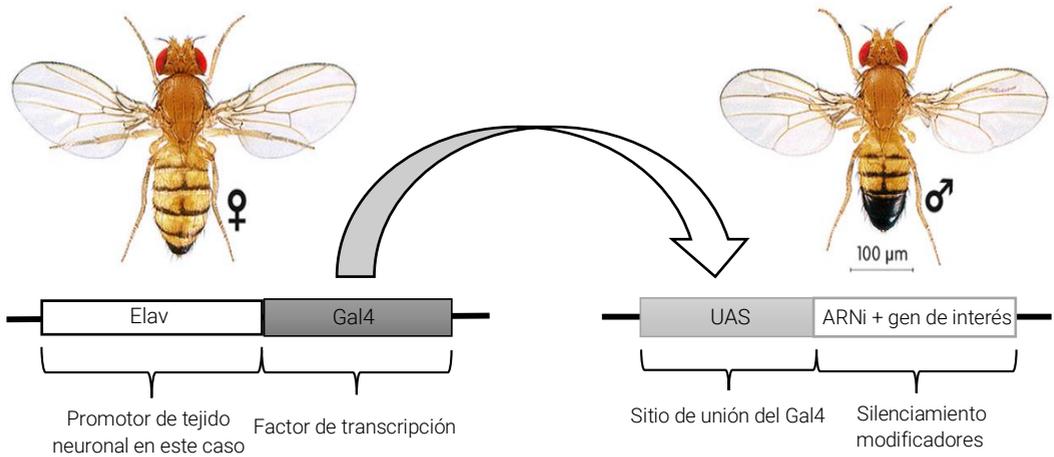


Figura 32. Esquema del funcionamiento del sistema UAS-Gal4.

Análisis de los genes candidatos

En primer lugar se analizó si había cambios en el tiempo de recuperación a crisis, los genotipos que no mostraron diferencias con respecto al control se descartaron para este trabajo (datos no mostrados). Tras esto se analizó la supervivencia, el vuelo y por último se validaron los cambios de expresión a través de PCRc. A continuación se muestra los resultados obtenidos agrupando todos los ensayos en cada uno de los genotipos. Para la generación de las líneas controles se hizo el mismo cruce que para las experimentales, pero en su caso el ARNi estaba vacío.

cac^{ARNi}

Cac, homólogo al gen *CACNA1A* en humanos, codifica para la subunidad $\alpha 1 A$ del canal dependiente de voltaje de calcio. El primer resultado mostró que se había logrado silenciar en un 50% la expresión del gen de interés (Figura 33A). En los datos de crisis (Figura 33B) se puede ver una reducción significativa en el tiempo de recuperación, pasando de 100 a 50s. La distribución de puntos muestra menos variabilidad en el genotipo ARNi, aunque hay alguna mosca cuyo tiempo de recuperación es considerablemente superior al de la media. A pesar de que a priori muestra una mejora las crisis, no tiene cambios en la distancia de estabilización del vuelo (Figura 33C), y empeoró ligeramente la supervivencia (Figura 33D).

Estos resultados apuntan a que el silenciamiento de este gen podría mejorar el tiempo de recuperación a crisis del modelo *para*^{bss1}, pero no otros fenotipos asociados como los problemas musculares o la reducción en su supervivencia. En modelos de ratón cuando se ha rebajado su expresión también se ha visto una mejoría en una parte del fenotipo epiléptico (Calhoun et al., 2018).

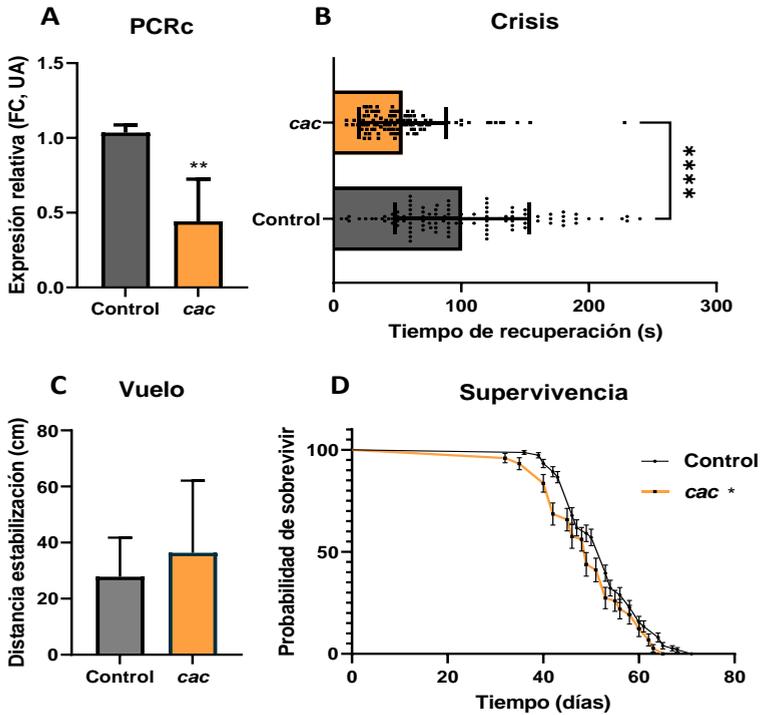


Figura 33. Resultados *cac*^{ARNi}. A) Expresión relativa del gen obtenida a través de ensayos de PCR cuantitativa normalizada y comparada con el gen constitutivo *rp49*. Los niveles de expresión se muestran como FC (factor de cambio) en unidades arbitrarias y referenciadas al control como valor 1. Para su análisis se empleó el método del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y estadísticamente se hizo el test t de student (**p-valor < 0,01). Datos obtenidos a partir de 15 moscas. B) Tiempo de recuperación a crisis tras dar un shock mecánico a través de un vortex. Para su análisis se hizo t de student (****p-valor < 0,001). La figura 2C muestra la distancia de estabilización durante el vuelo. Se empleó la prueba estadística Krustal-Wallis. D) Curvas de supervivencia de ambos genotipos. Se hizo el test Mantel-Cox (p*-valor<0,05). En los experimentos B, C Y D se usaron 15 moscas jóvenes por tubo en cada una de las tres repeticiones biológicas empleadas.

nAChR α 4^{ARNi}

nAChR α 4 es el gen homólogo al *CHRNA4* en humanos y constituye la subunidad α 4 del receptor de acetilcolina. La expresión del gen de interés cayó hasta el 25% (Figura 34A). En los datos de crisis se redujo significativamente el tiempo de recuperación, pasando de 100 a 80s (Figura 34B). De nuevo los datos del genotipo experimental del silenciamiento muestran una mejor agrupación que los controles. La distancia de estabilización también mejoró pasando de 28 a 18 (Figura 34B) y la supervivencia no mostró cambios entre genotipos (Figura 34D). El genotipo *nAChR α 4^{ARNi}* parecía mostrar una ligera mejoría en la supervivencia media pero finalmente estas moscas no fueron capaces de sobrevivir más allá de los 62 días de vida mientras que las controles alcanzaron los 70.

Estos datos indican que la reducción de la expresión de este gen podría tener buenos resultados en la mejora del fenotipo epiléptico y las alteraciones musculares del modelo *para^{bss1}*. Se han identificado algunas mutaciones en este gen en pacientes con epilepsia nocturna del lóbulo frontal autosómica dominante (Lopes-Cendes & Oliveira Ribeiro, 2013).

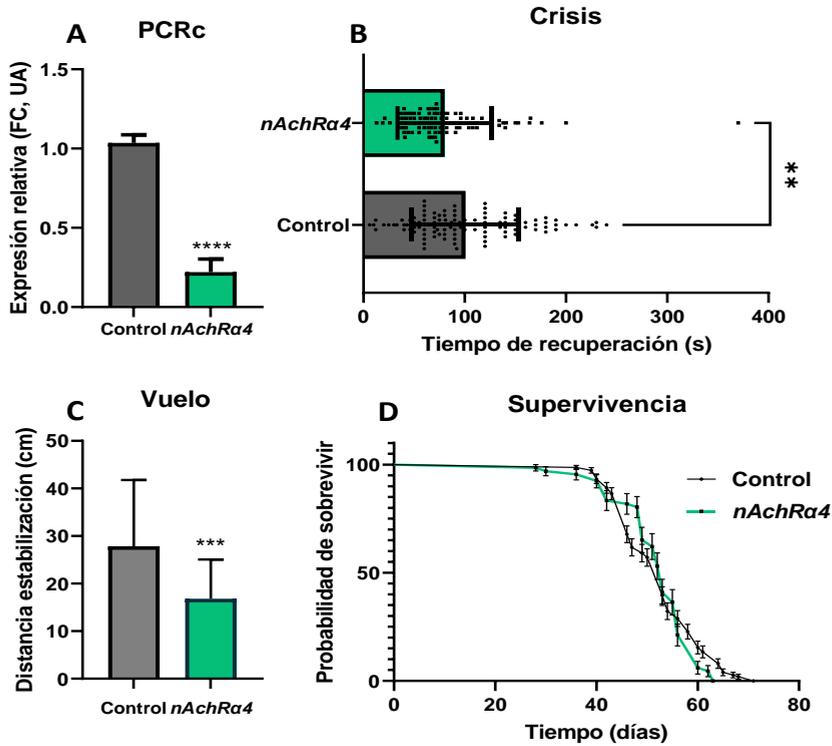


Figura 34. Resultados *nAchRa4*^{ARNi}. A) Expresión relativa del gen obtenida a través de ensayos de PCR cuantitativa normalizada y comparada con el gen constitutivo *rp49*. Los niveles de expresión se muestran como FC (factor de cambio) en unidades arbitrarias y referenciadas al control como valor 1. Para su análisis se empleó el método del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y estadísticamente se hizo el test t de student (****p-valor < 0,001). Datos obtenidos a partir de 15 moscas. B) Tiempo de recuperación a crisis tras dar un shock mecánico a través de un vortex. Para su análisis se hizo t de student (**p-valor < 0,01). La figura 2C muestra la distancia de estabilización durante el vuelo. Se empleó la prueba estadística t de student (**p-valor < 0,01). D) Curvas de supervivencia de ambos genotipos. Se hizo el test Mantel-Cox. En los experimentos B, C Y D se usaron 15 moscas jóvenes por tubo en cada una de las tres repeticiones biológicas empleadas.

nAChRa1^{ARNi}

nAChRa1 es el gen homólogo al *CHRNA2* en humanos, el cual conforma la subunidad $\beta 2$ del receptor de acetilcolina. Gracias a la técnica del ARNi la expresión relativa de este gen se redujo al 20% (Figura 35A). La cuantificación del tiempo de recuperación a crisis mostró un aumento del mismo en este genotipo (Figura 35B), también cabe destacar que muy pocas moscas se recuperaron rápidamente (<50s). En el caso del vuelo fueron capaces de estabilizarse a menor distancia que los controles (Fig 35C). A pesar de que algunas de las moscas del silenciamiento empezaron a morir antes, luego sobrevivieron más que los controles siendo el resultado final superior al control (Figura 35D).

Estos resultados mostrarían una mejora en el fenotipo muscular y de supervivencia del modelo *para^{bss1}* pero un empeoramiento en lo que se refiere a las crisis epilépticas. Este gen, igual que el anterior, también se ha relacionado con pacientes de epilepsia nocturna del lóbulo frontal autosómica dominante (Lopes-Cendes & Oliveira Ribeiro, 2013). También se han encontrado mutaciones en pacientes que presentaban calcificaciones de los ganglios basales y fenotipo epiléptico (Fjaer et al., 2015).

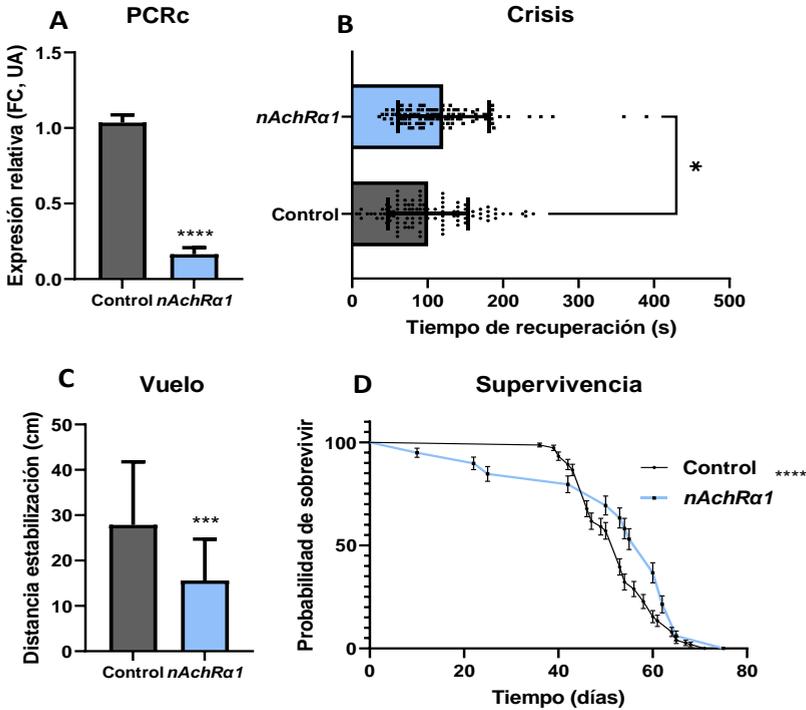


Figura 35. Resultados $nAChR\alpha1^{ARNi}$. A) Expresión relativa del gen obtenida a través de ensayos de PCR cuantitativa normalizada y comparada con el gen constitutivo $rp49$. Los niveles de expresión se muestran como FC (factor de cambio) en unidades arbitrarias y referenciadas al control como valor 1. Para su análisis se empleó el método del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y estadísticamente se hizo el test t de student (****p-valor < 0,001). Datos obtenidos a partir de 15 moscas. B) Tiempo de recuperación a crisis tras dar un shock mecánico a través de un vortex. Para su análisis se hizo t de student (*p-valor < 0,05). La figura 2C muestra la distancia de estabilización durante el vuelo. Se empleó la prueba estadística Kruskal-Wallis (***p-valor < 0,001). D) Curvas de supervivencia de ambos genotipos. Se hizo el test Mantel-Cox (****p-valor < 0,001). En los experimentos B, C Y D se usaron 15 moscas jóvenes por tubo en cada una de las tres repeticiones biológicas empleadas.

CIC- α ^{ARNi}

CIC- α codifica para la proteína 1 del canal de voltaje de cloro. Su silenciamiento provocó una disminución de la expresión a la mitad en el genotipo modificador (Figura 36A). En el experimento de tiempo de recuperación a crisis, este aumentó ligeramente respecto al control (Figura 36B). Al contrario que los anteriores genotipos de silenciamiento estudiados, las moscas *CIC- α ^{ARNi}* no se agruparon claramente, mostrando una variabilidad similar a las controles. La distancia de estabilización no mostró cambios, fue muy similar entre ambos genotipos experimentales (Figura 36C). Finalmente, la supervivencia siguió una tendencia similar al genotipo *nAChR α 1^{ARNi}*, mostrando una caída en la curva anterior a los controles pero finalmente invirtiendo esta tendencia (Figura 36D).

El silenciamiento de este gen en el modelo *para^{bss1}* no tendría alteraciones en sus defectos musculares, pero sí empeoraría el fenotipo epiléptico y mejoraría su supervivencia. Se secuenció este gen en afectados por síndromes epilépticos idiopáticos complejos y se encontraron con que un gran porcentaje de los mismos tenían mutaciones de pérdida de sentido en este gen (Chen et al., 2013).

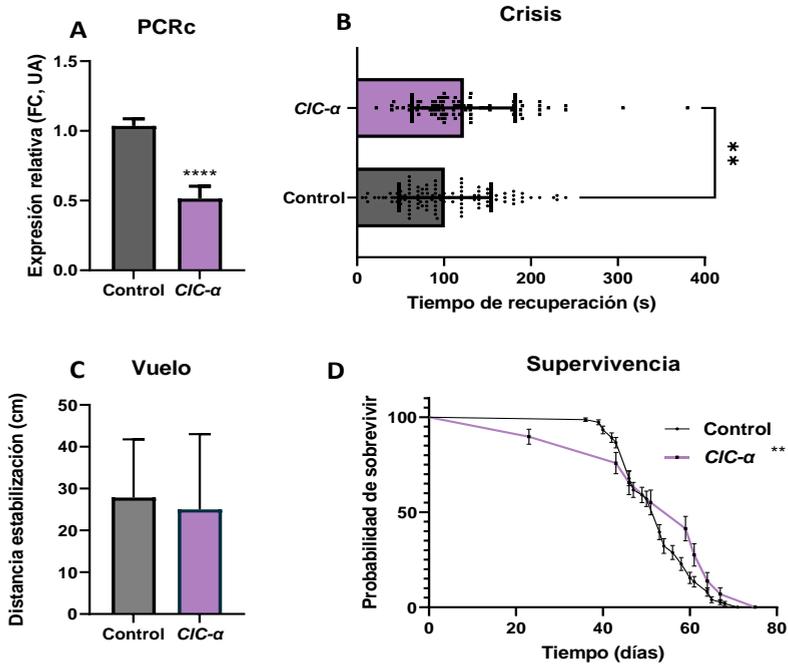


Figura 36 Resultados Clc-α^{ARNi}. A) Expresión relativa del gen obtenida a través de ensayos de PCR cuantitativa normalizada y comparada con el gen constitutivo rp49. Los niveles de expresión se muestran como FC (factor de cambio) en unidades arbitrarias y referenciadas al control como valor 1. Para su análisis se empleó el método del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y estadísticamente se hizo el test t de student (****p-valor < 0,001). Datos obtenidos a partir de 15 moscas. B) Tiempo de recuperación a crisis tras dar un shock mecánico a través de un vortex. Para su análisis se hizo t de student (**p-valor < 0,01). La figura 2C muestra la distancia de estabilización durante el vuelo. Se empleó la prueba estadística Krustal-Wallis. D) Curvas de supervivencia de ambos genotipos. Se hizo el test Mantel-Cox (**p-valor < 0,01). En los experimentos B, C Y D se usaron 15 moscas jóvenes por tubo en cada una de las tres repeticiones biológicas empleadas.

KCNQ3^{ARNi}

Se trata de un gen que codifica para una subfamilia del canal dependiente de voltaje de potasio. La cuantificación de los niveles de transcrito mostró que se había reducido la expresión del gen un 75% (Figura 37A). La recuperación tras una crisis fue mejor en el genotipo silenciado, aunque hubo pocos casos en los que esta fuera rápida (<50s) (Figura 37B). La agrupación de los valores en el genotipo silenciado volvió a ser mejor que la de los controles. La distancia de estabilización también fue menor, siendo 10cm más baja que la de las moscas *para^{bss1}* (Figura 37C). La supervivencia por su parte también mostró resultados positivos aumentando ligeramente (Figura 37D).

Todos estos resultados apuntan a que el gen *KCNQ3* podría ser un buen candidato a modificador. Se han descrito mutaciones en *KCNQ3* en familias con epilepsia neonatal familiar benigna y epilepsias familiares con crisis focales y discapacidad intelectual (Miceli et al., 2015; Lopes-Cendes & Oliveira Ribeiro, 2013).

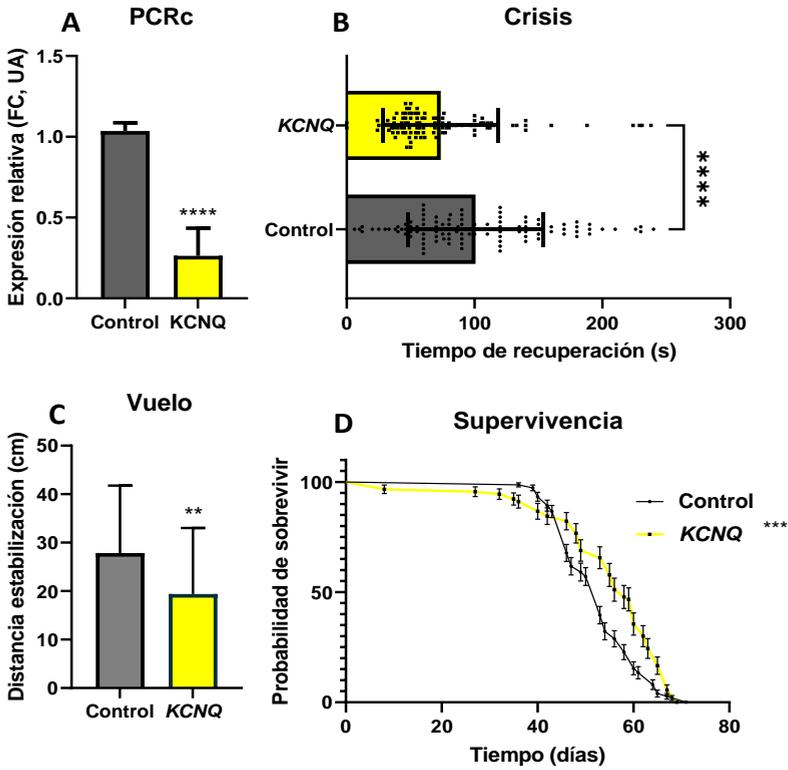


Figura 37. Resultados $KCNQ^{ARNi}$. A) Expresión relativa del gen obtenida a través de ensayos de PCR cuantitativa normalizada y comparada con el gen constitutivo rp49. Los niveles de expresión se muestran como FC (factor de cambio) en unidades arbitrarias y referenciadas al control como valor 1. Para su análisis se empleó el método del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y estadísticamente se hizo el test t de student (****p-valor < 0,001). Datos obtenidos a partir de 15 moscas. B) Tiempo de recuperación a crisis tras dar un shock mecánico a través de un vortex. Para su análisis se hizo t de student (****p-valor < 0,001). La figura 2C muestra la distancia de estabilización durante el vuelo. Se empleó la prueba estadística Krustal-Wallis (**p-valor < 0,01). D) Curvas de supervivencia de ambos genotipos. Se hizo el test Mantel-Cox (***p-valor < 0,001). En los experimentos B, C Y D se usaron 15 moscas jóvenes por tubo en cada una de las tres repeticiones biológicas empleadas

toy^{ARNi}

Toy es un factor de transcripción implicado en el desarrollo embrionario. Participa en la formación de: ojo, nariz, sistema nervioso central y páncreas. La técnica del silenciamiento redujo la expresión del gen hasta el 40% (Figura 38A). El tiempo de recuperación de las moscas ARNi fue superior (Figura 38B). La distancia que recorrieron en el ensayo de vuelo hasta su estabilización también fue mayor que los controles (Figura 38C). Finalmente la supervivencia fue claramente inferior en este genotipo desde edades muy tempranas (Figura 38D).

El conjunto de estos datos señala que el silenciamiento del gen *Toy* podría ser un claro intensificador para la mutación *para^{bss1}*. Si bien se conoce la función de este gen en múltiples funciones relacionadas con el sistema nervioso, no se ha logrado relacionar sus mutaciones con alteraciones en la función cognitiva (Thompson et al., 2004). Si se ha descrito que la regulación de su expresión a través de ciertos microARN puede conducir a epilepsia (Panjwani et al., 2016).

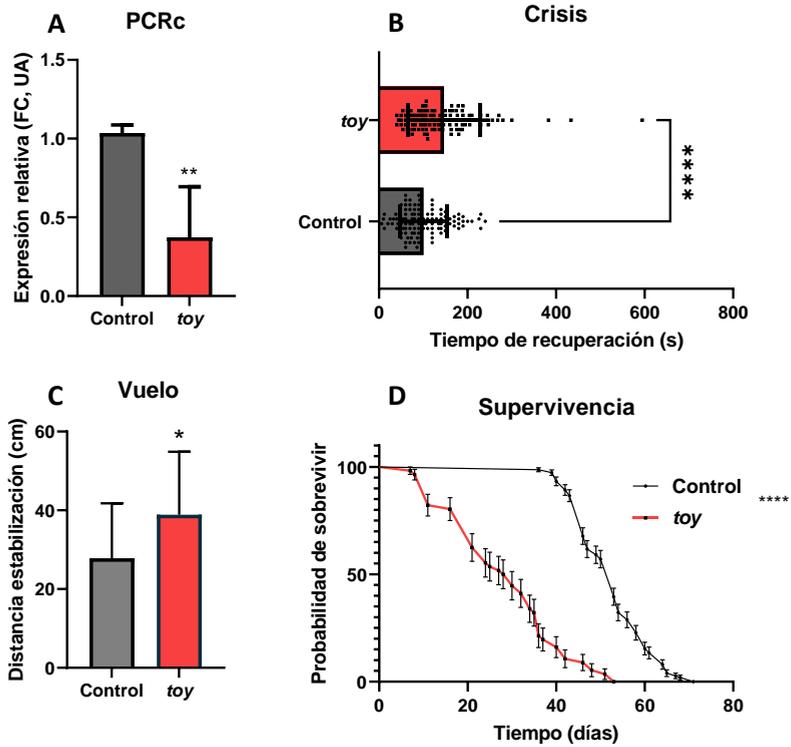


Figura 38 Resultados toy^{ARNi} . A) Expresión relativa del gen obtenida a través de ensayos de PCR cuantitativa normalizada y comparada con el gen constitutivo rp49. Los niveles de expresión se muestran como FC (factor de cambio) en unidades arbitrarias y referenciadas al control como valor 1. Para su análisis se empleó el método del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y estadísticamente se hizo el test t de student (**p-valor < 0,01). Datos obtenidos a partir de 15 moscas. B) Tiempo de recuperación a crisis tras dar un shock mecánico a través de un vórtex. Para su análisis se hizo el test t de student (****p-valor < 0,001). La figura 2C muestra la distancia de estabilización durante el vuelo. Se empleó la prueba estadística t de student (*p-valor < 0,05). D) Curvas de supervivencia de ambos genotipos. Se hizo el test Mantel-Cox (****p-valor < 0,001). En los experimentos B, C Y D se usaron 15 moscas jóvenes por tubo en cada una de las tres repeticiones biológicas empleadas.

Tratamientos

Como parte de diferentes colaboraciones se probó el efecto de algunos fármacos en las alteraciones de estas moscas controles *para^{bss1}*. Uno de ellos fue el harmol, un miembro de las beta carbolinas con efecto antidepressivo. Resultados previos en modelos de ratón mostraron su papel como mitohormético y mejoraron el metabolismo, el sistema muscular y la supervivencia de unos ratones sanos y envejecidos y de otros que se estaban usando como modelos prediabéticos. Distintas pruebas realizadas en nuestro modelo de estudio y en otros como *C.elegans* ayudaron a elucidar el mecanismo de acción de este fármaco, resultando ser regulador del receptor de GABA (resultados no mostrados ni publicados todavía). Los resultados obtenidos en el modelo *para^{bss1}* (Figura 39) mostraron un aumento de la supervivencia cuando este se incluyó en la dieta. Aunque no se observaron cambios en el tiempo de recuperación a crisis (resultados no mostrados), sería interesante el estudio de su papel como posible tratamiento para los efectos de la epilepsia.

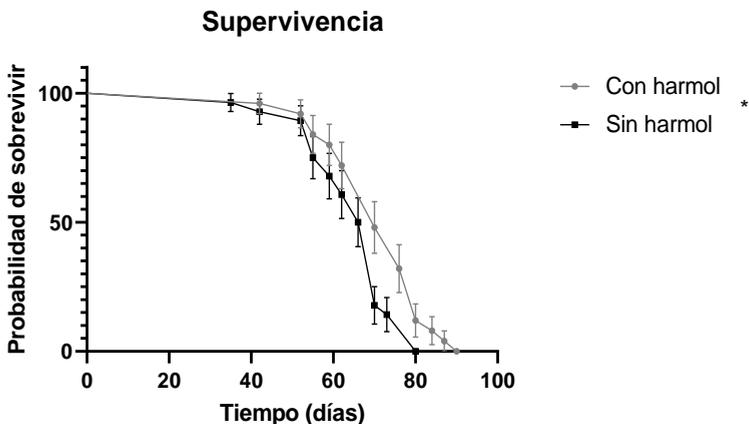


Figura 39. Efecto del harmol en la supervivencia del genotipo *para^{bss1}*. Se hizo el test Mantel-Cox (p^* -valor<0,05). Se usaron 15 moscas jóvenes por tubo en cada una de las tres repeticiones biológicas empleadas.

También se testó el bórax, una forma refinada de borato de sodio natural ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$). Se trata de una sal alcalina suave que ejerce como fuente multifuncional de óxido bórico (B_2O_3), el cual es beneficioso en procesos donde el sodio actúa como regulador. Aunque su mecanismo de acción está por elucidar, resultados positivos previos obtenidos por grupos colaboradores (resultados no mostrados ni publicados) motivaron realizar pruebas en el modelo *para^{bss1}*. Se cuantificó el tiempo de recuperación a crisis después de incluirlo en la comida de las moscas y se observó una disminución en el mismo (Figura 40). Algunas hipótesis que pudieran explicar esto serían su supuesta interacción química con los canales de sodio acoplados a bicarbonato, cuyas alteraciones se han relacionado con la epilepsia (M. D. Parker & Boron, 2013). El bórax también podría afectar directamente a los receptores de GABA, los cuales también son permeables al bicarbonato y al cloro, y provocar un desequilibrio en ellos (Hübner & Holthoff, 2013). Mutaciones que provocan este tipo de alteraciones en modelos animales como *C.elegans* han provocado una parálisis de estos animales debida a la falta de regulación de la excitabilidad neuronal a través de cambios en el pH (Bellemer et al., 2011).

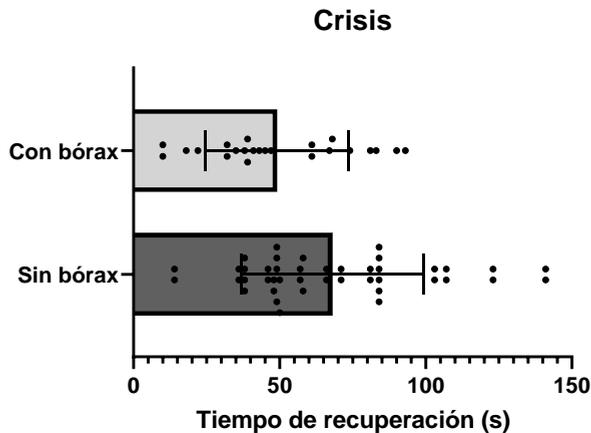


Figura 40. Tiempo de recuperación a crisis tras un vortex del genotipo *para^{bss1}* con bórax. Para su análisis se hizo t de student. Se usaron 15 moscas jóvenes por tubo en cada una de las tres repeticiones biológicas empleadas).

Discusión

La dificultad que entraña conocer la evolución de los pacientes del síndrome de Dravet, incluso tras su diagnóstico, es una cuestión clave para muchas familias. El origen genético de la enfermedad, y la disparidad de resultados obtenidos en los diferentes animales de investigación según su fondo genético, señalan a la posible existencia de genes modificadores que estén afectando a la sintomatología y progresión de la patología. En anteriores trabajos se hizo una preselección de genes y la puesta a punto de algunos ensayos para su evaluación (Ñungo Garzón, 2018). En este capítulo se recogieron los datos finales y se evaluó a través de ensayos de tiempo de recuperación a crisis, distancia de estabilización del vuelo y supervivencia, el potencial modificador de los siguientes genes: *cac*, *nAchRa4*, *toy*, *CIC-a*, *KCNQ*, *nAchRa1*. El modelo de *Drosophila melanogaster* empleado fue *para^{bss1}*, y la técnica el ARNi, la cual también se evaluó a través de PCRc. Todos estos genes tienen un ortólogo humano cuya función también está relacionada con el funcionamiento del sistema nervioso. A continuación se muestra una tabla resumen con los resultados obtenidos:

Gen	Crisis	Muscular/vuelo	superv
<i>cac</i>	+	=	-
<i>nAchRa4</i>	+	+	=
<i>toy</i>	-	-	-
<i>CIC-a</i>	-	=	+
<i>KCNQ</i>	+	=	+
<i>nAchRa1</i>	-	+	+

Tabla 4. Resumen de los resultados obtenidos de cada genotipo modificador en los diferentes ensayos llevados a cabo. El símbolo + quiere decir mejora y el – empeoramiento.

En lo que respecta a la modificación del fenotipo epiléptico los genotipos *cac*, *nAchRa4* y *KCNQ* lo mejoraron mientras que *toy*, *CIC-a* y *nAchRa1* lo empeoraron. Estos resultados no se reprodujeron en el caso del ensayo del vuelo ni la supervivencia. El único genotipo que mostró resultados reproducibles en todos los ensayos fue *toy*, el cual resultó ser intensificador. Los genotipos *nAchRa4* y *KCNQ* mejoraron en al menos dos ensayos, y no empeoraron ninguno. El silenciamiento funcionó, aunque mostró cierta variabilidad asociada a la técnica. En futuros ensayos se podría analizar la expresión del propio gen *para* y también se podría repetir todo el trabajo teniendo como objeto de estudio las hembras. Se podría profundizar en la relación entre crisis y muerte prematura en *Drosophila melanogaster*, ya que aunque en ratones está ampliamente descrita, en las moscas existe cierta ambigüedad (Reynolds, 2018).

La mayoría de estudios enfocados en la búsqueda de modificadores en modelos animales se centra únicamente en el fenotipo epiléptico (Nicole A. Hawkins et al., 2021; Calhoun et al., 2018). Por el contrario, cuando los análisis se enfocan a los pacientes lo habitual es asignar una puntuación a cada niño y niña teniendo cuenta los parámetros de crisis, movilidad y nivel cognitivo. Tras esto se agrupan en más o menos afectados y dentro de cada uno de esos grupos es donde se produce la búsqueda de los modificadores (de Lange et al., 2020; Hammer et al., 2017). Los resultados de este estudio ponen de manifiesto que la variabilidad fenotípica que tienen los pacientes también la tienen los modelos animales y por tanto encontrar un modificador que afecte a diversos síntomas es tarea ardua. Quizás la variabilidad en el fondo genético se puede mejorar en el caso de los estudios en animales respecto a los humanos, pero sigue teniendo un papel transcendental (de Lange et al., 2020; Miller et al., 2014; N. A. Hawkins & Kearney, 2012; Guerrini et al., 2010; Depienne et al., 2010; Catterall et al., 2010; Suls et al., 2010; Yu et al., 2006; Pineda-Trujillo et al., 2005). Los estudios en animales deberían estudiar otros problemas asociados a la patología más allá de las crisis mientras que los análisis en humanos deberían agrupar a los individuos no solo por su estado general, sino también por el grado de afectación en cada uno de los fenotipos por separado. De este modo no solo resultaría más fructífera la búsqueda de

modificadores sino que también ofrecerían una atención más personalizada a cada uno de los pacientes.

En un artículo reciente de pacientes del síndrome de Dravet, aquellos que habían sido clasificados como menos graves mostraron tener menor cantidad de mutaciones en variantes raras no patogénicas en genes relacionados con excitabilidad en neuronal, epilepsia y defectos (Hammer et al., 2017). Este resultado sugeriría que múltiples variantes serían las que afectarían a como se manifiesta una enfermedad monogénica, y dichas variantes podrían no afectar del mismo modo si la mutación que provoca la enfermedad es distinta en cada paciente. Dichas variantes también podrían afectar a su vez a los genes modificadores y combinarse, lo multiplicaría mucho las probabilidades a la hora de entender la variabilidad existente en la patología. Además, aquellas que fueran protectoras no estarían sometidas a la selección negativa, con lo cual podrían ser abundantes. Otros factores que pueden influir en la variabilidad individual de la enfermedad podrían ser desde el manejo clínico (de Lange et al., 2020; Ceulemans, 2011) hasta el mosaicismo genético (Depienne et al., 2010; Gennaro et al., 2006) o incluso las variantes en otras regiones reguladoras (Zeng et al., 2014; Long et al., 2008).

Los resultados de aumento de supervivencia y disminución del tiempo de recuperación a crisis con la adición a la comida de harmol y bórax respectivamente, abren la puerta a su estudio en ratones modelo del síndrome de Dravet y quién sabe si algún día en pacientes.

Discusión general

Discusión general

A lo largo de esta tesis doctoral se ha descrito la generación y caracterización de un alelo "knock-out" en el gen *para* de *Drosophila melanogaster* como herramienta de investigación y desarrollo terapéutico en el síndrome de Dravet. En dicho modelo la expresión del gen *para* se eliminó por completo, dando lugar a un alelo nulo. En cuanto a viabilidad, dicho alelo se puede considerar un letal recesivo. El estudio de del estadio de letalidad estableció que esta se producía al final del desarrollo embrionario sin defectos anatómicos evidentes. Genéticamente, se puede considerar un alelo dominante haploinsuficiente con respecto a convulsiones y a otros fenotipos de enfermedades neurológicas. Los defectos neuromusculares, conductuales y de aprendizaje recuerdan mucho a los presentes en pacientes de síndrome de Dravet, del mismo modo que las alteraciones electrofisiológicas. El aumento de las corrientes persistentes de sodio y los defectos en la conducción nerviosa presentes en el modelo *para*^{KO} son alteraciones típicas de epilepsia y canalopatías de sodio. Las moscas *para*^{KO} heterocigotas presentaron un perfil metabólico desequilibrado, coherente con una disfunción mitocondrial, aumento de estrés oxidativo y neuroinflamación (Tapia et al., 2021). Los efectos positivos del tratamiento con imanes de las crisis epilépticas en este modelo abren las puertas a nuevas terapias para el síndrome de Dravet. Todos estos resultados demuestran que el modelo generado denominado *para*^{KO} es un buen modelo del síndrome de Dravet, útil no solo para profundizar en el estudio de la enfermedad, si no también para la búsqueda de biomarcadores y futuras terapias.

La búsqueda de modificadores genéticos empleando el modelo *para*^{bss1} mostró algunos resultados positivos en el caso de los genes *nAChRa4*, *KCNQ* y *cac* y propuso el gen *toy* como intensificador. La variabilidad obtenida en estos datos sugiere nuevas maneras de llevar a cabo este tipo de estudios, así como ayudar a entender que los genes modificadores pueden tener un papel importante en algunos aspectos del síndrome de Dravet, pero no pueden explicar toda la variabilidad clínica entre pacientes.

Existen otros muchos factores como otras alteraciones genéticas o incluso el manejo clínico, que pueden influir en dicha variabilidad.

Los resultados obtenidos de disminución del tiempo de recuperación a crisis y el aumento de la supervivencia tras el tratamiento con bórax y harmol respectivamente, son realmente interesantes, y su testado en modelos superiores sería un gran paso en su camino como nueva terapia para el síndrome de Dravet.

Conclusiones

Conclusiones

1. La escisión del primer exón del gen *para* a través de la técnica de la recombinación homóloga resultó exitosa para generar una pérdida de función del gen. La posterior generación de modelos “*knock-in*” con el gen humano no fue posible debido a la dificultad técnica de dicho proceso.
2. Las consecuencias de dicha pérdida fueron significativas para el organismo. Las temperaturas elevadas provocaron crisis epilépticas, y cuando estas fueron de larga duración, resultaron letales. Los mutantes generados también mostraron defectos musculares y cognitivos.
3. La terapia con imanes consiguió abordar el fenotipo epiléptico, disminuyendo la cantidad de moscas que convulsionaban y la duración de dichos episodios. Además, también logró retrasar su aparición.
4. El genotipo *para*^{KO} también mostró alteraciones metabólicas, marcadas por el aumento de aminoácidos, lactato, succinato y GABA. Dichas tendencias no se mantuvieron en parte de los lípidos. Todas estas alteraciones podrían estar relacionadas con la epilepsia y una posible disfunción mitocondrial.
5. El estudio electrofisiológico de las corrientes de sodio en las motoneuronas aCC de las moscas KO dejó entrever un aumento en las corrientes persistentes y en su ratio con las transitorias, siendo todo ello una posible causa de las crisis epilépticas.
6. La búsqueda de modificadores genéticos empleando el modelo *para*^{bss1} obtuvo resultados positivos para los genes *nAChRa4* y *KCNQ*. Por el contrario, el gen *toy* resultó ser un intensificador.

7. Los fármacos harmol y bórax testados en el genotipo *para*^{bss1} mostraron una mejora en su supervivencia y el tiempo de recuperación a crisis respectivamente y abren una nueva vía de estudio para su uso en modelos superiores y en última instancia en pacientes.

Materiales y métodos

Material y métodos

Biología molecular

Este apartado está principalmente dirigido a la generación del modelo *para*^{KO}, aunque hay excepciones como las PCR cuantitativas del modelo *para*^{bss1}.

Diseño del plásmido

El plásmido a inyectar se construyó a partir del vector pTV cherry obtenido del Dr. Baena-López. El proceso metodológico del proceso de la recombinación homóloga se detalla en la introducción del Capítulo 1. Finalmente se escindieron 12pb a partir del codón de inicio del primer exón codificante del gen *para*. El diseño molecular se hizo con ayuda del programa SeqBuilder (ADNSTAR; Madison, Wisconsin). En la Tabla 4 se muestran todos los cebadores empleados durante el proceso.

Clonaciones

La amplificación de los insertos de ADN a clonar se hizo por PCR convencional a partir de ADN genómico extraído de la cepa salvaje de *Drosophila melanogaster Oregon-R*. El brazo de homología 3' se amplificó con la enzima ADN polimerasa "Taq" de Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, EEUU). En cambio, debido a problemas técnicos, para la clonación del brazo de homología 5' se utilizó el kit de clonaje TOPO de Invitrogen (Waltham, Massachusetts, EEUU). Para ello primero se hizo una PCR cuyo fragmento se amplificó con la ADN polimerasa de Biotools (Madrid, España), y una vez este se insertó en el vector TOPO, empleando la polimerasa de alta fidelidad "phusion" de Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, EEUU) se consiguió amplificar de la secuencia definitiva mediante PCR anidada. Para los intentos de clonación del gen *SCN1A* humano se emplearon técnicas de clonación clásica y kits como el ensamblaje Gibson sin resultados fructíferos. Todas las enzimas se usaron con un programa temperaturas y tiempos adecuados para la extensión y amplificación

óptima de los fragmentos siguiendo las especificaciones de los fabricantes. Todos los cebadores se diseñaron manualmente excepto los de las PCRC de los modificadores, para los cuales se empleó la librería universal de Roche.

Las enzimas de restricción usadas para la clonación de los fragmentos de homología fueron de Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, EEUU) y de New England Biolabs (Ipswich, Massachusetts, EEUU). Las ligaciones posterior se hicieron con la ADN ligasa T4 (Thermo Fisher Scientific; Waltham, Massachusetts, EEUU). Las purificaciones pertinentes se hicieron con los kits de purificación GeneJET para PCR y gel (Thermo Fisher Scientific; Waltham, Massachusetts, EEUU).

Para el proceso de transformación se utilizó la cepa de *E. coli* DH5 α (Thermo Fisher Scientific; (Waltham, Massachusetts, EEUU). Para aislar el ADN de estas bacterias se empleó el kit GeneJET Plasmid miniprep (Thermo Fisher Scientific; Waltham, Massachusetts, EEUU).

El porcentaje de agarosa (Scharlab; Barcelona, España) de adaptó al tamaño de los fragmentos siendo el más comúnmente empleado el 0.8%. Para la tinción del ADN se utilizó "Gel Red" (Biotium, Fremont, California). Las muestras fueron cargadas en el gel añadiéndoles el tampón de carga 6x "LoadingDye" de Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, EEUU). Las electroforesis se realizaron a un voltaje de 100 V durante 20-30 min. Como marcador molecular se empleó el "GeneRuler" ADN 1kb (Thermo Fisher Scientific; Waltham, Massachusetts, EEUU). Como marcador de concentración además de tamaño, también se empleó el fago Lambda de Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, EEUU).

Para la secuenciación se enviaron las muestras a un servicio externo del propio centro (Servicio de genética y genómica transcripcional del Centro de Investigación Príncipe Felipe). En la Tabla 4 se muestran los cebadores empleados para la secuenciación. La técnica de secuenciación empleada fue la secuenciación Sanger.

Extracción de ADN

- En primer lugar se seleccionaron los individuos (entre 15-20 por replicado biológico) y se congelaron a -80°C durante al menos una noche o con ayuda de nitrógeno líquido instantáneamente.
- Posteriormente se añadieron 200 μl de tampón de lisis (100mM Tris-HCl a pH 7.5, 100mM EDTA, 100mM NaCl, 1% SDS) y se machacaron con la ayuda de un homogeneizador de tejidos o mortero acorde al tamaño a los tubos.
- Se añadieron de nuevo 200 μl del tampón de lisis y se siguió machacando.
- Las muestras se incubaron a 65°C durante 30 minutos.
- Se añadieron 800 μl de solución LiCl/KAc (1 parte de 5M KAc y 2.5 partes de 6M LiCl) y se incubaron en hielo durante 10 minutos.
- Se centrifugaron durante 15 minutos a 13.000rpm.
- Se transfirieron 800 μl del sobrenadante a un tubo nuevo evitando coger los restos flotantes de la interfase.
- Se añadieron 500 μl de isopropanol, se mezclaron y se centrifugaron 15 minutos más a 13.000rpm.
- Se eliminó el sobrenadante y se añadieron 200 μl de etanol al 70%, se centrifugaron 5 minutos a 13.000rpm y se dejaron secar con el tubo abierto.
- Se resuspendió el precipitado en 150 μl de 100mM Tris (pH 7) y se almacenaron las muestras a -20°C .

Extracción ARN, RT-PCR (PCR con transcriptasa inversa), PCRC

- Se añadieron 600 μL de Trizol (Thermo Fisher Scientific; Waltham, Massachusetts, EEUU) a las 15-20 moscas previamente congeladas y se homogenizaron con un mortero.
- Se incubaron las muestras en hielo 5 minutos.
- Se añadieron 120 μL de cloroformo, las muestras se agitaron vigorosamente durante 15 segundos y se incubaron en hielo.

- Se centrifugaron a 12.000rcf 15 minutos a 4°C.
- Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo de microcentrífuga, se añadieron 300µL de isopropanol y se agitaron los tubos para hacer precipitar el ARN.
- Se dejaron 30 minutos en hielo y se centrifugaron a 12.000rcf 15 minutos a 4°C.
- Se eliminó el sobrenadante, se añadió al pellet 375µL de etanol al 75% (recién preparado con agua RNAsa free) y se centrifugaron a 12.000rcf durante 5 minutos a 4°C.
- Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el pellet de ARN al aire durante aproximadamente 25 minutos.
- Se añadieron 10µL de agua libre de nucleasas y se resuspendió el pellet.
- Siempre que se pudo, se eliminó el ADN con DNasa I – “*Amplification Grade*” (Sigma-Aldrich; Saint Louis, Misuri, EEUU). Para ello:
 - Se añadió 1µL del tampón de reacción 10X, 1µL de DNasa y se incubó durante 30 minutos a 37°C.
 - Se añadió 1µL de solución de parada y se incubó durante 15 minutos a 70°C.
- Las muestras se almacenaron a -80°C.

Una vez obtenido el ARN, con el fin de obtener ADN se empleó el kit de retrotranscripción “*qScript cDNA SuperMix*” (Quantabio; Beverly, Massachusetts, EEUU) siempre partiendo de 500ng de ARN y siguiendo el protocolo marcado por la casa comercial. El termociclador que se empleó fue un Veriti (Applied Biosystems; Foster City, California, EEUU). Una vez terminada la reacción, las muestras se almacenaron a -20°C.

Para conocer los niveles de ARN se hicieron PCR cuantitativas. Para ello, se empleó “*SYBR Green Master Mix*” (Applied Biosystems; Foster City, California, EEUU). El sistema de detección de fluorescencia usado fue el LightCycler 480 (Roche; Basilea, Suiza).

Todas las muestras se analizaron por triplicado y la expresión génica se calculó mediante el método 2DDCt, normalizándose los niveles de expresión a los del gen referencia rp49.

Cuantificación del material genético

Tras terminar las extracciones se realizaron las cuantificaciones de ADN y ARN mediante el espectrofotómetro "*NanoDrop*" ND 1000 (Thermo Fisher Scientific; Waltham, Massachusetts, EEUU).

Trabajo con *Drosophila melanogaster*

Cepas de moscas, mantenimiento y generación de transgénicos

Las moscas empleadas en los experimentos se mantuvieron a 25°C dentro de tubos de plástico con 9ml de comida. Cada 3-4 días se transfirieron a tubos nuevos para asegurar su supervivencia. En los casos en que se empleó el CO₂ para manipular y aislar las moscas, siempre se dejó media hora para su recuperación. A continuación se explica la receta y el procedimiento para la preparación de 2L de comida o medio de cultivo para las moscas.

- Se preparó una mezcla con los siguientes ingredientes: 20g de agar para comida, 20g de harina de soja, 120g de harina de maíz y 100g de azúcar.
- Se calentaron en el microondas 1,2l de agua destilada 5 minutos a 800W.
- Se añadió la mezcla del primer paso junto a 60g de levadura al agua calentada y homogeneizó todo con la batidora.
- Se autoclavó la mezcla homogenizada para esterilizarla durante 15 minutos a 121°C.
- A la ya papilla autoclavada se añadieron 800ml de agua destilada calentada en el microondas 5 minutos a 800W.

- También se incluyeron 6g de nipagin (metil 4-hidroxibenzoato) disuelto en 20ml de etanol 96° como antibacteriano, y 10ml ácido propiónico como antifúngico.
- Se homogeneizó de nuevo toda la mezcla de la papilla, el agua caliente, el antifúngico y el antibacteriano con la batidora.
- Finalmente se dispensó el medio de cultivo en los tubos, 9ml en cada uno de ellos, con la máquina Masterflex L/S Easy-Load III (Cole-Parmer; Vernon Hills, Illinois, EEUU [Estados Unidos]).
- Se cubrieron los tubos con una pequeña sábana y se dejaron reposar durante toda la noche a temperatura ambiente.
- A la mañana siguiente se taparon los tubos con tapones especiales antiácidos y se almacenaron a 4°C para
- su mejor conservación. Antes de su uso, se atemperaron.

En la Tabla 5 se muestra el nombre, genotipo, origen y descripción de las cepas de moscas empleadas a lo largo del trabajo.

Genotipos experimentales

El genotipo experimental empleado en los Capítulos I y II fueron las hembras resultantes del cruce de las hembras *para*^{KO} con machos Canton S, es decir, *w*¹¹¹⁸, *para*^{KO}/*w*, *para*⁺. Para el caso del Control se hizo el mismo cruce pero partiendo de hembras hermanas a las KO en las que no se había producido la recombinación homóloga, siendo por tanto *w*¹¹¹⁸ *para*⁺/*w*⁺, *para*⁺.

En el Capítulo III se emplearon machos de la descendencia del cruce de hembras *para*^{bss1}; *elav-Gal4/Cyo* con machos de cada uno de los ARNi. Para el caso de control se empleó el ARNi vacío.

Para la selección de los transformantes del proceso de la recombinación homóloga una vez realizada la inyección en los embriones, se procedió al crecimiento de los

mismos y a su cruce con la cepa equilibradora. En la Figura 41 se puede observar un esquema general de los cruces que se realizaron para el mapeo del inserto.

En el primer cruce, la mosca inyectada tendrá el inserto en uno de los cromosomas. Al cruzarlo por la cepa equilibradora se seleccionaron solo las moscas con ojos rojos, marcador que indicó que tenían el inserto. Si la inserción hubiera sido en el cromosoma X, todas las hembras de la F1 del primer cruce habrían sido rojas. Luego, se realizó un segundo cruce con la cepa equilibradora para determinar en qué cromosoma estaba, si en el II o el III, según los marcadores que aparecieron en la descendencia. Si la inserción hubiera sido en el cromosoma II las moscas de ojo rojo solo tendrían uno de ambos marcadores en ese cromosoma, y lo mismo habría sucedido para el caso del cromosoma III. En cambio las moscas de ojo blanco, al no tener inserción, mostrarán todos los marcadores de ambos cromosomas.

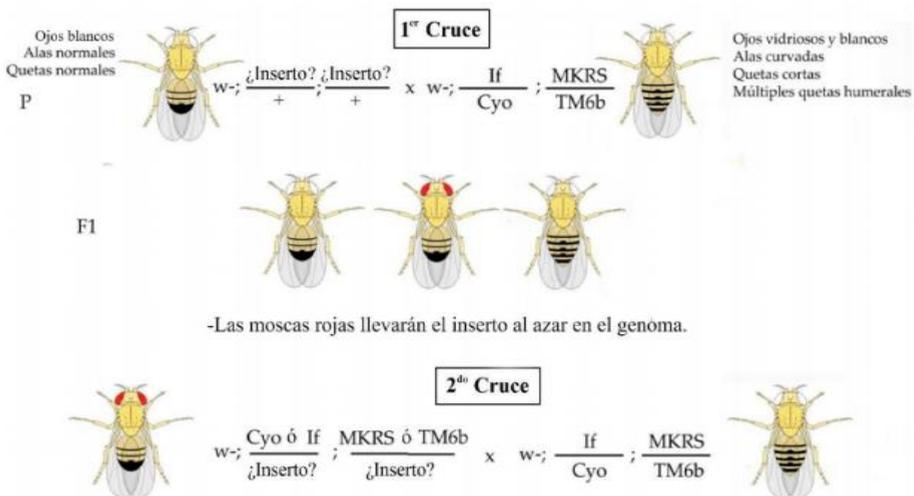


Figura 41. Esquema de los cruces realizados para el cartografiado de la inserción. Los puntos y comas separan los cromosomas I, II y III. Las siglas If, Cyo, MKRS y TM6b hacen referencia a los cromosomas equilibradores que sirven para seguir y mapear la inserción. Imagen modificada. Fuente: Tesis doctoral del Dr. Víctor López del Amo.

Recolección de embriones para analizar la expresión génica

Para conocer cuál era la expresión del gen *para* en el mutante KO, teniendo en cuenta la letalidad de este alelo nulo, se generaron moscas *para*^{KO}/*FM7c-GPF*. Partiendo de la hipótesis de que la pérdida de función del gen no afectaría a la viabilidad del organismo en estadios tan tempranos como el de embrión, se aislaron aquellos que no eran fluorescentes y por tanto homocigotos *para*^{KO}. El primer paso de la recolección de embriones consistió en la preparación de comida especial para ello. Esta fue la receta empleada para la elaboración de 20 placas:

- Se hirvieron 300ml de ddH₂O junto con 10g de agar para comida (Scharlab; Barcelona, España) como espesante.
- Se añadieron 100ml de zumo de manzana y 6 ml de nipagin (Scharlab; Barcelona, España) como antifúngico. Para la preparación de este último se disolvieron 6g de metil 4-hidroxibenzoato en 20ml de etanol 96°.
- Se esterilizó la mezcla unos minutos en el microondas.
- Se vertió el contenido en placas petri rellenándolas aproximadamente hasta la mitad.
- Una vez solidificó, se colocó una pequeña cantidad de levadura fresca en el centro de la placa.

Finalmente se durmieron y seleccionaron las hembras vírgenes y los machos para el cruce y se colocaron en las placas tapadas con un vaso perforado y enganchado con una goma elástica para evitar que escaparan.

Entre las 12-24h después de poner el cruce se quitaron los adultos y se recogieron los embriones. Para ello, se añadió un poco de agua sobre la placa y con ayuda de un filtro a modo de colador se atraparon. Tras esto con ayuda de un pincel se cogieron y se pasaron a tubos, se congelaron y se procedió con el protocolo de extracción adaptando la cantidad de reactivo a la de muestra. Se emplearon un total de 20 embriones de cada genotipo.

Recolección de embriones para determinar la fase letal

Para mantener el stock *para*^{KO}, debido a su letalidad en homo y hemicigosis, se balanceó con el cromosoma FM7c. Con el fin de conocer más en profundidad el estadio en el cual la escisión del gen para provocaba la muerte del organismo, se añadió el marcador *GFP* al FM7c anteriormente mencionado. Se siguió el protocolo mencionado en el apartado anterior para la recolección de embriones y estos fueron seleccionados según la ausencia o presencia de la fluorescencia del marcador *GFP*. Aquellos negativos para dicho marcador se dejaron crecer y se analizaron en la lupa.

Supervivencia

Durante el ensayo de supervivencia de las moscas *para*^{bss1} se cuantificó el tiempo de vida de cada genotipo. Para ello, se introdujeron entre 10 y 20 moscas en tubos con comida y se dieron pases cada 3-4 días. Cada vez que se hizo el cambio de tubo, se anotó la cantidad de moscas muertas. Se usaron 15 moscas en cada una de las tres repeticiones biológicas.

Para el ensayo de supervivencia con harmol, este se añadió a la comida a una concentración de 25µg/ml.

En el caso de la cuantificación de la supervivencia al ayuno las moscas se pasaron a tubos sin comida con un pedazo de papel impregnado en agua. Al cabo de 40h se cuantificó el número de moscas muertas. Se usaron 10-15 moscas de 4-5 días de vida de cada réplica biológica y se hicieron triplicados.

Geotaxis negativa

Este ensayo se usó para conocer el estado muscular general de las moscas (Ali et al., 2011). La teoría detrás del mismo se basa en que las moscas presentan geotaxis negativa, es decir, tienden a trepar por la superficie de los tubos de manera innata. Para estudiar este fenómeno en las moscas *para*^{KO}, primero se pasaron entre 10-15 moscas

a tubos sin comida para que se acostumbraran a no tenerla durante media hora aproximadamente, tras esto se hizo una línea en el borde superior de los tubos, a 8cm de la base (Figura 42). A continuación, el ensayo consistió en golpear fuertemente los tubos contra la base i contar en menos de 10s cuantas habían superado trepando el límite dibujado anteriormente. Esto se repitió 5 veces y se hizo una media. Se usaron 10-15 moscas de 4-5 días de vida de cada réplica biológica y se hicieron triplicados.



Figura 42. Montaje para hacer el ensayo del climbing.

Ensayo de locomoción

Este experimento se hizo entender la movilidad y el grado de ansiedad de las moscas (Mohammad et al., 2016). Del mismo modo que los ratones y otros animales, cuando se encuentran en un espacio cerrado, las moscas tienden a caminar pegadas a las paredes porque se sienten más seguras. Antes de encerrarlas en este espacio circular denominado arena, se dejaron media hora aproximadamente sin comida para que se acostumbraran a la ausencia de la misma. Tras esto, se cogió a un individuo y se aisló en la arena. Esta superficie denominada arena se constituye por una lupa la base sobre la cual hay un foco de luz inferior cubierto con un folio y tapado con una placa Petri. A continuación se dejó que la mosca caminara durante 10 minutos aproximadamente

mientras que en la parte superior de la lupa sin el cabezal se sujetó una webcam que grabó todo (Martin, 2004) (Figura 43).

La grabación del vídeo se realizó mediante el programa informático VirtualDub, que posteriormente permitió obtener una foto cada 0.5 segundos. Una vez obtenidas las imágenes, se cargaron en el programa ImageJ. Este programa, gracias al contraste que provoca la luz en las fotos, permitió diferenciar claramente el cuerpo de la mosca oscuro frente a su entorno más claro. Con todo esto, se generó un archivo con las coordenadas de la mosca en cada foto y una imagen del recorrido de la misma (Figura 42). A continuación se introdujeron esos datos en Excel y con las expresiones matemáticas pertinentes se calculó la distancia recorrida, la velocidad media y el tiempo que pasó en el centro de la arena y no en los bordes. Se usaron 10 moscas de 4-5 días de vida de cada réplica biológica y se hicieron triplicados. Este experimento se hizo en el modelo *para*^{KO}.

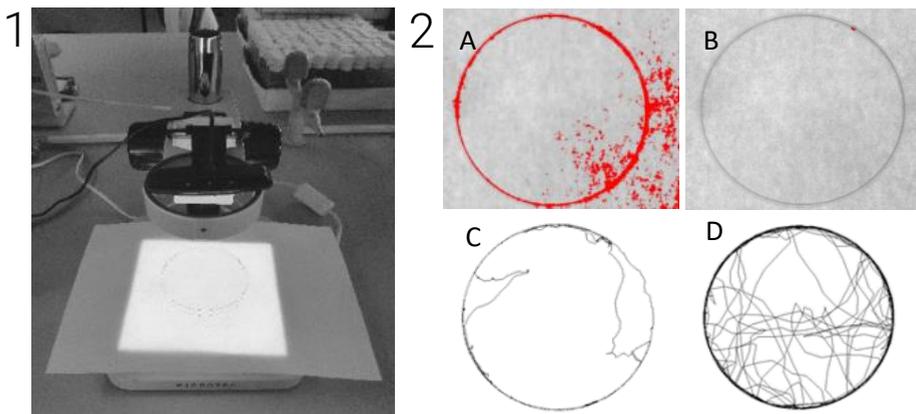


Figura 43. 1: Imagen de la estructura empleada para el ensayo de locomoción. 2: las imágenes A y B muestran el procesamiento de los vídeos. C representa una mosca que apenas se ha movido, todo lo contrario de la D.

Ensayo de vuelo

El ensayo de vuelo sirvió para evaluar el estado funcional del circuito neuromuscular implicado en este movimiento a través de su altura de estabilización (Babcock & Ganetzky, 2014). En primer lugar, las moscas se dejaron media hora aproximadamente sin comida para que se acostumbraran su ausencia. A continuación se lanzaron los tubos donde estaban metidas con ayuda de un deslizador y un embudo por un tubo de 90cm cuyas paredes tenían un plástico recubierto de pegamento para insectos (Bricofam). Una vez se lanzó cada tubo de 15 moscas de 4-5 días de vida de cada triplicado biológico se desenvolvió el plástico y se fotografió (Figura 44). Con ayuda del ImageJ se cuantificó la distancia de estabilización de cada genotipo. Este experimento se hizo tanto en el modelo *para*^{KO} como en el *para*^{bss1}.



Figura 44. La fotografía de la izquierda muestra el sistema empleado para lanzar las moscas y la derecha como quedan pegadas al plástico para su posterior cuantificación

Aprendizaje y memoria

Con el fin de descubrir si las moscas tenían déficits cognitivos a nivel de aprendizaje y memoria a corto plazo se llevó a cabo un ensayo denominado de aversión fototóxica (Ali et al., 2011). Este ensayo usa como base teórica la fototaxis de las moscas, es decir, su tendencia a caminar hacia la luz de manera innata. Para hacer este ensayo hizo falta un laberinto denominado laberinto en T que se fabricó de manera casera (Figura 45).



Figura 45. Imagen del equipo empleado para el ensayo de aprendizaje y memoria.

En primer lugar se dejó a las moscas durante 16h en ayuno con solo agua para que estuvieran más receptivas a los sabores. A continuación se aislaron de una en una en tubos de ensayo y se dejaron en una sala oscura donde solo había una luz roja durante al menos dos minutos para que se acostumbraran. Después de esto se cubrió el tubo donde estaba la mosca con papel de aluminio para mantenerlo en oscuridad y se insertó a un lado del laberinto en T. Al otro lado de la barrera el otro tubo tenía un papel impregnado en 120 μ l de quinina 0.1M (Sigma-Aldrich; Saint Louis, Misuri, EEUU), una sustancia de sabor desagradable para las moscas. Este lado también tenía una fuente de luz muy fuerte hacia la cual las moscas sienten gran atracción. Antes del ensayo se realizó un entrenamiento para cerciorarse de que la mosca aprendía que aunque quisiera ir a la luz no debía porque la única recompensa que obtenía era el sabor

amargo de la quinina. Durante este acondicionamiento la mosca estuvo en el lado no iluminado y en el momento se abrió a barrera se iluminó el otro extremo, durante un minuto se dejó que la mosca explorara yendo hacia donde prefiriera. Esto se repitió 6 veces y a continuación se hizo las cuantificaciones, en las cuales se contó si la mosca atravesaba la barrera hacia el lado con luz o no en menos de 10 segundos. Esto se repitió durante 5 veces más y se calculó el porcentaje de veces que las moscas evitaban la luz y si por tanto habían aprendido. Para estudiar la memoria a corto plazo se repitió el experimento con las mismas moscas al cabo de 6h. También hubo que comprobar que la mosca la primera vez que se expuso a la luz fue hacia ella para asegurarse de que no tiene problemas en el campo de visión que hicieran que no respondiera debidamente al estímulo. Se usaron 10 moscas de 4-5 días de vida de cada réplica biológica y se hicieron triplicados. Este experimento se llevó a cabo en el modelo *para*^{KO}. No fue posible realizar el ensayo a ciegas por la falta de personal del laboratorio, pero sí se grabó parte del ensayo y se compartió con compañeros del centro de investigación que no conocían los genotipos para observar si las cuantificaciones coincidían.

Crisis mecánicas

Para este ensayo se pasaron 10-15 moscas del genotipo *para*^{bss1} a tubos vacíos sin comida y se esperó media hora hasta que se aclimataron. Entonces se aplicó un estímulo mecánico a través de un vórtex de 10s a máxima potencia. Después de esto las moscas quedaron totalmente inmóviles y se grabó su recuperación, es decir, hasta que se pusieron de pie y caminaron con normalidad (L. Parker, Padilla, et al., 2011). Se usaron 10-15 moscas de 4-5 días de vida de cada replica biológica y se hicieron triplicados.

Para analizar el efecto del bórax en las crisis se usó una concentración de 0.59mM en la comida de las moscas.

Crisis térmicas

Para cuantificar las crisis epilépticas producidas por calor las moscas *para*^{KO} se pasan a tubos vacíos durante media hora aproximadamente y a continuación se sumergen en un baño de agua caliente a 40°C durante 2 minutos (Sun et al., 2012). En este caso se cuantificó la cantidad y el momento en el que daba comienzo la crisis ya que la recuperación tras las mismas una vez puestas a temperatura ambiente fue muy rápida. Se usaron 10-15 moscas de 4-5 días de vida de cada réplica biológica y se hicieron triplicados.

Estatus epiléptico

El estatus epiléptico se define como una o diversas crisis incontroladas de larga duración. Para intentar reproducir este fenómeno, se introdujo las moscas *para*^{KO} que estaban en tubos vacíos en el baño al 37,5°C ± 0.1. A priori esta temperatura no produce ningún efecto en las moscas, pero al cabo de media hora, las moscas epilépticas entraron en crisis. Tras esto, se dejaron 15 minutos más sometidas al estímulo y posteriormente se cuantificó el número de moscas fallecidas. Se usaron 10-15 moscas de 4-5 días de vida de cada réplica biológica y se hicieron triplicados.

Imán

Para conocer el efecto del imán durante las crisis en el genotipo *para*^{KO}, las moscas se pusieron sobre su superficie tapadas con la parte superior de una placa Petri. Se dejaron durante media hora a temperatura ambiente para que se acostumbraran, acto seguido los bordes se cubrieron con Parafilm y el conjunto se sumergió en un baño transparente de agua caliente a 42,5°C durante 5 minutos aproximadamente (Figura 46). Se grabó todo el proceso y luego se cuantificó la cantidad, aparición y duración de las crisis. Las características del imán empleado fueron las siguientes: Ø 60 mm, alto 30[A] mm, neodimio, N40 (magnetizado), niquelado. Se compró de casa comercial

Supermagnete (Gottmadingen, Alemania), donde también se pidió fabricar uno exactamente igual pero desmagnetizado que se usó como control.



Figura 46. Imágenes de la realización de los experimentos del imán y el montaje de las moscas en la superficie del imán.

Ensayos de electrofisiología

Todos los ensayos de electrofisiología se llevaron a cabo en el modelo *para*^{KO}.

Electroshock

Se recolectaron larvas hembra de tercer estadio, se lavaron con agua y se secan con papel. Posteriormente se transfirieron a placas de plástico y cuando recobraron su movilidad normal se usó una sonda conductora compuesta de dos filamentos de tungsteno de 0.1 mm de diámetro separadas por una distancia de 1,2 mm para dar el choque eléctrico. Para ello se colocaron los filamentos sobre la superficie anterior dorsal de las larvas, aproximadamente donde se encuentra su sistema nervioso central y se aplicó un pulso de 30V durante 3 segundos con el Grass S88 stimulator (Grass instruments, RI USA). En respuesta al estímulo eléctrico se observó una parálisis transitoria en la cual las larvas se contrajeron tónicamente y ocasionalmente mostraron espasmos. Se cuantificó el tiempo que tardaron las larvas en recuperaran su movilidad normal, hacia adelante y de manera peristáltica, como el tiempo de recuperación.

Pinzas de voltaje y de corriente (*"patch and voltage clamp"*)

Para los experimentos de pinzas de voltaje y de corriente se usaron los electrodos de vidrio de borosilicato de paredes gruesas GC100F-10 (Harvard Apparatus, Edenbridge, UK) entre resistencias de 10-15 Ω para las larvas de tercer estadio. Se empleó el pulidor P- 1000 (Sutter Instrument, USA). Los registros se hicieron con el amplificador Multiclamp 700B, controlado por pCLAMP (versión 10.2, Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

La capacitancia se midió integrando el área debajo de la capacidad transitoria resultante del paso de -60 a -90mV del protocolo. Para medir la excitabilidad de la membrana se inyectó corriente de manera continua (pasos de 4pA, 0-70 pA/500ms) y se midió la cantidad de picos. Posteriormente se filtraron de 20 kHz a 5kHz las medidas obtenidas y se filtró la el potencial de membrana en mV. Los programas usados para registrar las señales fueron Multiclamp y Clampex y para el análisis se usó Clampfit

La identificación de las motoneuronas aCC i RP2 se hizo según su tamaño y su posición en el cordón nervioso ventral. Para practicar esto se usó un marcaje con 0.1% Alexa fluor 488 hydrazide, sodium salt (Molecular Probes, Eugene, OR), que se incluyó en la solución salina.

Disoluciones

La receta de la disolución externa para la disección y el registro habitual de señales sinápticas (mM): 135 NaCl, 5KCl, 4 MgCl₂, 2 CaCl₂, 5 TES y 36 sacarosa. El pH se ajustó a 7,15 empleando NaOH. La disolución externa salina para medir el sodio fue (mM): 100 NaCl, 6 KCl, 50 TEA-Cl, 10 4-aminopiridina, 2 MgCl₂·6 H₂O, 10 Hepes, 10 sacarosa, 0,2 CdCl₂. El pH se ajustó a 7,1 empleando HCl. La disolución interna del sodio (mM): 140 CsCH₃SO₃, 5 CsCl₂, 2 MgCl₂·6 H₂O, 2 EGTA, 20 Hepes. El pH se ajustó a 7.4 con 5M CsOH. Para los experimentos de excitabilidad de la membrana se añadió 1mM de clorhidrato de mecamilamina con el fin de bloquear la actividad espontánea. KCl,

NaOH, NaCl y sacarosa fueron obtenidos de Fisher Scientific (Loughborough, UK). Hepes, MgCl₂ y CaCl₂ se obtuvieron de BDH (Poole, UK). La procedencia del resto de compuestos químicos fue Sigma-Aldrich (Saint Louis, Misuri, EEUU).

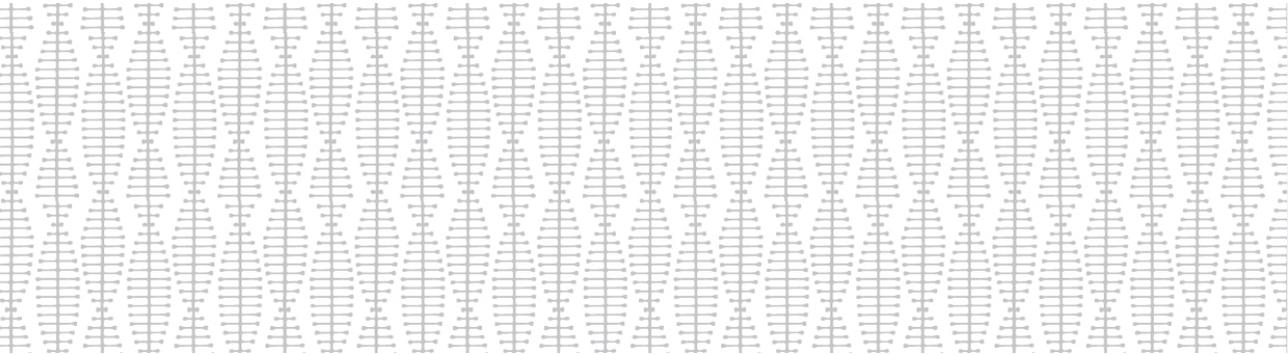
Uniones neuromusculares

Los axones motores fueron eléctricamente estimulados en los segmentos 3 y 4 succionando con un electrodo el extremo cortado del nervio (aproximadamente de 10µm de diámetro interior). Se usó una disolución salina HL3 con 1.0 mM Ca²⁺ (Stewart et al., 1994) y electrodos de 20–30 MΩ conectados a un preamplificador Axoclamp 2A (Axon Instruments Inc., Foster City, CA). Los datos se adquirieron y analizaron usando Digidata 1322A (Axon Instruments Inc.) y pCLAMP 10.2 (Axon Instruments Inc.)

Estadística e ilustración

Para las representaciones gráficas y los análisis estadísticos empleados se utilizó el programa GraphPadPrism 5 (GraphPad Software, Inc, California) y el Excel (Microsoft, Albuquerque). Para conocer la normalidad se hizo el test Kolmogorov-Smirnov. Cuando las muestras fueron normales y para comparaciones entre el grupo control y el grupo KO se hizo un análisis t de student. Cuando no fue así, se aplicó el test no paramétrico Mann Whitney. En comparaciones múltiples normales se hizo un test anova unidireccional o bidireccional seguido por Bonferroni post test o Kruskal-Wallis test en el caso del test no paramétrico. Para los experimentos de supervivencia se utilizó el método Mantel-Cox. La significancia estadística de todos los análisis se midió con el parámetro p-valor, tomando como referencia el valor de α 0,05 (95% de intervalo de confianza). Los valores representados en los gráficos son medias \pm sus desviaciones estándar.

Bibliografía



Bibliografía

- Ademuwagun, I. A., Rotimi, S. O., Syrbe, S., Ajamma, Y. U., & Adebisi, E. (2021). *Voltage Gated Sodium Channel Genes in Epilepsy: Mutations , Functional Studies , and Treatment Dimensions*. *12*(March), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.600050>
- Afrikanova, T., Serruys, A. S. K., Buenafe, O. E. M., Clinckers, R., Smolders, I., de Witte, P. A. M., Crawford, A. D., & Esguerra, C. V. (2013). Validation of the Zebrafish Pentylentetrazol Seizure Model: Locomotor versus Electrographic Responses to Antiepileptic Drugs. *PLoS ONE*, *8*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054166>
- Akiyama, M., Kobayashi, K., Yoshinaga, H., & Ohtsuka, Y. (2010). A long-term follow-up study of Dravet syndrome up to adulthood. *Epilepsia*, *51*(6), 1043–1052. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02466.x>
- Albano, C., Cupello, A., Mainardi, P., Scarrone, S., & Favale, E. (2006). Successful treatment of epilepsy with serotonin reuptake inhibitors: Proposed mechanism. *Neurochemical Research*, *31*(4), 509–514. <https://doi.org/10.1007/s11064-006-9045-7>
- Ali, Y. O., Escala, W., Ruan, K., & Zhai, R. G. (2011). Assaying locomotor, learning, and memory deficits in Drosophila models of neurodegeneration. *Journal of Visualized Experiments*, *49*, 2504. <https://doi.org/10.3791/2504>
- Babcock, D. T., & Ganetzky, B. (2014). An improved method for accurate and rapid measurement of flight performance in drosophila. *Journal of Visualized Experiments*, *84*(84), 51223. <https://doi.org/10.3791/51223>
- Baena-Lopez, L. A., Alexandre, C., Mitchell, A., Pasakarnis, L., & Vincent, J. P. (2013). Accelerated homologous recombination and subsequent genome modification in Drosophila. *Development (Cambridge)*, *140*(23), 4818–4825.

<https://doi.org/10.1242/dev.100933>

- Bagley, J. A., Reumann, D., Bian, S., Lévi-Strauss, J., & Knoblich, J. A. (2017). Fused cerebral organoids model interactions between brain regions. *Nature Methods*, 14(7), 743–751. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4304>
- Bahceci, D., Anderson, L. L., Occelli Hanbury Brown, C. V., Zhou, C., & Arnold, J. C. (2020). Adolescent behavioral abnormalities in a *Scn1a*+/- mouse model of Dravet syndrome. *Epilepsy and Behavior*, 103(Pt A). <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2019.106842>
- Baraban, S. C., Dinday, M. T., & Hortopan, G. A. (2013). Drug screening in *Scn1a* zebrafish mutant identifies clemizole as a potential Dravet syndrome treatment. *Nature Communications*, 4. <https://doi.org/10.1038/ncomms3410>
- Bayona, D. (2017). El Síndrome De Dravet: Una Tormenta Eléctrica Que No Podemos Evitar. *Biol. on-Line*, 6(1), 1–29. https://revistes.ub.edu/index.php/b_on/article/view/17941
- Bellemer, A., Hirata, T., Romero, M. F., & Koelle, M. R. (2011). Two types of chloride transporters are required for GABA A receptor-mediated inhibition in *C. elegans*. *EMBO Journal*, 30(9), 1852–1863. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.83>
- Boguszewicz, Ł., Jamroz, E., Ciszek, M., Emich-Widera, E., Kijonka, M., Banasik, T., Skorupa, A., & Sokół, M. (2019). NMR-based metabolomics in pediatric drug resistant epilepsy – preliminary results. *Scientific Reports*, 9(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51337-z>
- Brand, a H., & Perrimon, N. (1993). *Ature. Development (Cambridge, England)*, 118(2), 401–415.
- Brunklaus, A., Ellis, R., Reavey, E., Semsarian, C., & Zuberi, S. M. (2014). Genotype phenotype associations across the voltage-gated sodium channel family. *Journal of Medical Genetics*, 51(10), 650–658. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2014->

102608

- Burrows, D. R. W., Samarut, Liu, J., Baraban, S. C., Richardson, M. P., Meyer, M. P., & Rosch, R. E. (2020). Imaging epilepsy in larval zebrafish. *European Journal of Paediatric Neurology*, 24(xxxx), 70–80. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2020.01.006>
- Calhoun, J. D., Hawkins, N. A., Zachwieja, N. J., & Kearney, J. A. (2018). Dravet syndrome. *58(8)*, 1–10. <https://doi.org/10.1111/epi.13811>.Cacna1g
- Catterall, W. A. (2014). Sodium channels, inherited epilepsy, and antiepileptic drugs. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 54, 317–338. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011112-140232>
- Catterall, W. A. (2018). *HHS Public Access*. 42(9), 2495–2504. <https://doi.org/10.1007/s11064-017-2314-9>.Forty
- Catterall, W. A., Goldin, A. L., & Waxman, S. G. (2019). Voltage-gated sodium channels (version 2019.4) in the IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology Database. *IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology CITE*, 2019(4), 1–25. <https://doi.org/10.2218/gtopdb/f82/2019.4>
- Catterall, W. A., Kalume, F., & Oakley, J. C. (2010). NaV1.1 channels and epilepsy. *Journal of Physiology*, 588(11), 1849–1859. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.187484>
- Cetica, V., Chiari, S., Mei, D., Parrini, E., Grisotto, L., Marini, C., Pucatti, D., Ferrari, A., Sicca, F., Specchio, N., Trivisano, M., Battaglia, D., Contaldo, I., Zamponi, N., Petrelli, C., Granata, T., Ragona, F., Avanzini, G., & Guerrini, R. (2017). Clinical and genetic factors predicting Dravet syndrome in infants with SCN1A mutations. *Neurology*, 88(11), 1037–1044. <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000003716>
- Ceulemans, B. (2011). Overall management of patients with Dravet syndrome. *Developmental Medicine and Child Neurology*, 53(SUPPL. 2), 19–23.

<https://doi.org/10.1111/j.1469-8749.2011.03968.x>

- Chen, T. T., Klassen, T. L., Goldman, A. M., Marini, C., Guerrini, R., & Noebels, J. L. (2013). Novel brain expression of CIC-1 chloride channels and enrichment of CLCN1 variants in epilepsy. *Neurology*, *80*(12), 1078–1085. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31828868e7>
- Cross, J. H., Caraballo, R. H., Nabbout, R., Vigeveno, F., Guerrini, R., & Lagae, L. (2019). Dravet syndrome: Treatment options and management of prolonged seizures. *Epilepsia*, *60*(S3), S39–S48. <https://doi.org/10.1111/epi.16334>
- Dare, S. S., Merlo, E., Curt, J. R., Ekanem, P. E., Hu, N., & Berni, J. (2021). *Drosophila para bss Flies as a Screening Model for Traditional Medicine : Anticonvulsant Effects of Annona senegalensis*. *11*(January), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.606919>
- De Jonghe, P. (2011). Molecular genetics of Dravet syndrome. *Developmental Medicine and Child Neurology*, *53*(SUPPL. 2), 7–10. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8749.2011.03965.x>
- de Lange, I. M., Mulder, F., van 't Slot, R., Sonsma, A. C. M., van Kempen, M. J. A., Nijman, I. J., Ernst, R. F., Knoers, N. V. A. M., Brilstra, E. H., & Koeleman, B. P. C. (2020). Modifier genes in SCN1A-related epilepsy syndromes. *Molecular Genetics and Genomic Medicine*, *8*(4), 1–16. <https://doi.org/10.1002/mgg3.1103>
- Deconinck, T., Jordanova, A., & Jonghe, P. De. (2009). *DATABASE IN BRIEF The SCN1A Variant Database : a Novel Research and Diagnostic Tool*. *920*(June), 904–920. <https://doi.org/10.1002/humu.21083>
- Depienne, C., Trouillard, O., Gourfinkel-An, I., Saint-Martin, C., Bouteiller, D., Graber, D., Barthez-Carpentier, M. A., Gautier, A., Villeneuve, N., Dravet, C., Livet, M. O., Rivier-Ringenbach, C., Adam, C., Dupont, S., Baulac, S., Héron, D., Nabbout, R., & LeGuern, E. (2010). Mechanisms for variable expressivity of inherited SCN1A mutations causing Dravet syndrome. *Journal of Medical Genetics*, *47*(6), 404–410.

<https://doi.org/10.1136/jmg.2009.074328>

Dravet, C. (2011). The core Dravet syndrome phenotype. *Epilepsia*, 52(SUPPL. 2), 3–9. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2011.02994.x>

During, M. J., & Spencer, D. D. (1993). Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain. *The Lancet*, 341(8861), 1607–1610. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)90754-5](https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)90754-5)

Fjaer, R., Brodtkorb, E., Øye, A. M., Sheng, Y., Vigeland, M. D., Kvistad, K. A., Backe, P. H., & Selmer, K. K. (2015). Generalized epilepsy in a family with basal ganglia calcifications and mutations in SLC20A2 and CHRN2. *European Journal of Medical Genetics*, 58(11), 624–628. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2015.10.005>

Fogle, K. J., Smith, A. R., Satterfield, S. L., Gutierrez, A. C., Hertzler, J. I., McCardell, C. S., Shon, J. H., Barile, Z. J., Novak, M. O., & Palladino, M. J. (2019). Ketogenic and anaplerotic dietary modifications ameliorate seizure activity in Drosophila models of mitochondrial encephalomyopathy and glycolytic enzymopathy. *Molecular Genetics and Metabolism*, 126(4), 439–447. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2019.01.008>

Frank, C. A., Wang, X., Collins, C. A., Rodal, A. A., Yuan, Q., Verstreken, P., & Dickman, D. K. (2013). New approaches for studying synaptic development, function, and plasticity using Drosophila as a model system. *Journal of Neuroscience*, 33(45), 17560–17568. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3261-13.2013>

Gaily, E., Anttonen, A. K., Valanne, L., Liukkonen, E., Träskelin, A. L., Polvi, A., Lommi, M., Muona, M., Eriksson, K., & Lehesjoki, A. E. (2013). Dravet syndrome: New potential genetic modifiers, imaging abnormalities, and ictal findings. *Epilepsia*, 54(9), 1577–1585. <https://doi.org/10.1111/epi.12256>

GARZÓN, Ñ., & CAROLINA, N. (2018). *de modificadores de susceptibilidad a crisis epilépticas y anormalidades de comportamiento en un modelo de Drosophila melanogaster con mutaciones del gen para. 1*, 2016–2017.

<https://riunet.upv.es/handle/10251/110512>

- Gataullina, S., & Dulac, O. (2017). From genotype to phenotype in Dravet disease. *Seizure*, *44*(2017), 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2016.10.014>
- Gennaro, E., Santorelli, F. M., Bertini, E., Buti, D., Gaggero, R., Gobbi, G., Lini, M., Granata, T., Freri, E., Parmeggiani, A., Striano, P., Veggiotti, P., Cardinali, S., Bricarelli, F. D., Minetti, C., & Zara, F. (2006). Somatic and germline mosaicisms in Severe Myoclonic Epilepsy of Infancy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *341*(2), 489–493. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.12.209>
- George, A. L. (2005). Inherited disorders of voltage-gated sodium channels. *Journal of Clinical Investigation*, *115*(8), 1990–1999. <https://doi.org/10.1172/JCI25505>
- Giono, L. E. (2017). Artículo Especial Crispr / Cas9 Y La Terapia Génica. *Medicina*, *77*(5), 405–409. <https://medicinabuenosaires.com/revistas/vol77-17/n5/405-409-Med6753-Giono.pdf>
- Griffin, A., Hamling, K. R., Hong, S. G., Anvar, M., Lee, L. P., & Baraban, S. C. (2018). Preclinical animal models for Dravet syndrome: Seizure phenotypes, comorbidities and drug screening. *Frontiers in Pharmacology*, *9*(JUN), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00573>
- Guerrini, R. (2012). Dravet syndrome: The main issues. *European Journal of Paediatric Neurology*, *16*(SUPPL. 1), S1. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2012.04.006>
- Guerrini, R., Cellini, E., Mei, D., Metitieri, T., Petrelli, C., Pucatti, D., Marini, C., & Zamponi, N. (2010). Variable epilepsy phenotypes associated with a familial intragenic deletion of the SCN1A gene. *Epilepsia*, *51*(12), 2474–2477. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2010.02790.x>
- Hammer, M. F., Ishii, A., Johnstone, L., Tchourbanov, A., Lau, B., Sprissler, R., Hallmark, B., Zhang, M., Zhou, J., Watkins, J., & Hirose, S. (2017). Rare variants of small effect size in neuronal excitability genes influence clinical outcome in Japanese

- cases of SCN1A truncation-positive Dravet syndrome. *PLoS ONE*, *12*(7), 1–16.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180485>
- Harkin, L. A., McMahon, J. M., Iona, X., Dibbens, L., Pelekanos, J. T., Zuberi, S. M., Sadleir, L. G., Andermann, E., Gill, D., Farrell, K., Connolly, M., Stanley, T., Harbord, M., Andermann, F., Wang, J., Batish, S. D., Jones, J. G., Seltzer, W. K., Gardner, A., ... Wirrell, E. (2007). The spectrum of SCN1A-related infantile epileptic encephalopathies. *Brain*, *130*(3), 843–852.
<https://doi.org/10.1093/brain/awm002>
- Hawkins, N. A., & Kearney, J. A. (2012). Confirmation of an epilepsy modifier locus on mouse chromosome 11 and candidate gene analysis by RNA-Seq. *Genes, Brain and Behavior*, *11*(4), 452–460. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2012.00790.x>
- Hawkins, Nicole A., Martin, M. S., Frankel, W. N., Kearney, J. A., & Escayg, A. (2011). Neuronal voltage-gated ion channels are genetic modifiers of generalized epilepsy with febrile seizures plus. *Neurobiology of Disease*, *41*(3), 655–660.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2010.11.016>
- Hawkins, Nicole A., Nomura, T., Duarte, S., Barse, L., Williams, R. W., Homanics, G. E., Mulligan, M. K., Contractor, A., & Kearney, J. A. (2021). Gabra2 is a genetic modifier of Dravet syndrome in mice. *Mammalian Genome*, *32*(5), 350–363.
<https://doi.org/10.1007/s00335-021-09877-1>
- Hawkins, Nicole A., & Kearney, J. A. (2017). *Sodium Channel Mutations*. 20–23.
<https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2015.11.016.Hlf>
- Hedrich, U. B. S., Liautard, C., Kirschenbaum, D., Pofahl, M., Lavigne, J., Liu, Y., Theiss, S., Slotta, J., Escayg, A., Dihné, M., Beck, H., Mantegazza, M., & Lerche, H. (2014). Impaired action potential initiation in GABAergic interneurons causes hyperexcitable networks in an epileptic mouse model carrying a human Nav1.1 mutation. *Journal of Neuroscience*, *34*(45), 14874–14889.

<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0721-14.2014>

- Higurashi, N., Uchida, T., Lossin, C., Misumi, Y., Okada, Y., Akamatsu, W., Imaizumi, Y., Zhang, B., Nabeshima, K., Mori, M. X., Katsurabayashi, S., Shirasaka, Y., Okano, H., & Hirose, S. (2013). A human Dravet syndrome model from patient induced pluripotent stem cells. *Molecular Brain*, *6*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-6-19>
- Hirose, S., Scheffer, I. E., Marini, C., Jonghe, P. De, Andermann, E., Goldman, A. M., Kauffman, M., Tan, N. C. K., Lowenstein, D. H., Sisodiya, S. M., Ottman, R., & Berkovic, S. F. (2013). *SCN1A testing for epilepsy: Application in clinical practice*. *54*(5), 946–952. <https://doi.org/10.1111/epi.12168>
- Honda, T. (1984). Amino acid metabolism in the brain with convulsive disorders. Part 3: Free amino acid patterns in cerebrospinal fluid in infants and children with convulsive disorders. *Brain and Development*, *6*(1), 27–32. [https://doi.org/10.1016/S0387-7604\(84\)80006-6](https://doi.org/10.1016/S0387-7604(84)80006-6)
- Hortopan, G. A., Dinday, M. T., & Baraban, S. C. (2010). Zebrafish as a model for studying genetic aspects of epilepsy. *DMM Disease Models and Mechanisms*, *3*(3–4), 144–148. <https://doi.org/10.1242/dmm.002139>
- Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J. E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., McLaren, S., Sealy, I., Caccamo, M., Churcher, C., Scott, C., Barrett, J. C., Koch, R., Rauch, G. J., White, S., ... Stemple, D. L. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, *496*(7446), 498–503. <https://doi.org/10.1038/nature12111>
- Huang, J., Zhou, W., Watson, A. M., Jan, Y. N., & Hong, Y. (2008). Efficient ends-out gene targeting in drosophila. *Genetics*, *180*(1), 703–707. <https://doi.org/10.1534/genetics.108.090563>
- Hübner, C. A., & Holthoff, K. (2013). Anion transport and GABA signaling. *Frontiers in*

- Cellular Neuroscience*, 7(OCT), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00177>
- Hurst, D. L. (1990). Epidemiology of Severe Myoclonic Epilepsy of Infancy. *Epilepsia*, 31(4), 397–400. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1990.tb05494.x>
- Hwang, W. Y., Fu, Y., Reyon, D., Maeder, M. L., Tsai, S. Q., Sander, J. D., Peterson, R. T., Yeh, J. R. J., & Joung, J. K. (2013). Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology*, 31(3), 227–229. <https://doi.org/10.1038/nbt.2501>
- Izsak, J., Seth, H., Andersson, M., Vizlin-Hodzic, D., Theiss, S., Hanse, E., Ågren, H., Funa, K., & Illes, S. (2019). Robust generation of person-specific, synchronously active neuronal networks using purely isogenic human iPSC-3D neural aggregate cultures. *Frontiers in Neuroscience*, 13(APR). <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00351>
- Jansen, F. E., Sadleir, L. G., Harkin, L. A., Vadlamudi, L., McMahon, J. M., Mulley, J. C., Scheffer, I. E., & Berkovic, S. F. (2006). Severe myoclonic epilepsy of infancy (Dravet syndrome): Recognition and diagnosis in adults. *Neurology*, 67(12), 2224–2226. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000249312.73155.7d>
- Jiao, J., Yang, Y., Shi, Y., Chen, J., Gao, R., Fan, Y., Yao, H., Liao, W., Sun, X. F., & Gao, S. (2013). Modeling Dravet syndrome using induced pluripotent stem cells (iPSCs) and directly converted neurons. *Human Molecular Genetics*, 22(21), 4241–4252. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt275>
- Kahlig, K. M., Misra, S. N., & George, A. L. (2006). Impaired inactivation gate stabilization predicts increased persistent current for an epilepsy-associated SCN1A mutation. *Journal of Neuroscience*, 26(43), 10958–10966. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3378-06.2006>
- Kalume, F., Westenbroek, R. E., Cheah, C. S., Yu, F. H., Oakley, J. C., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (2013). Sudden unexpected death in a mouse model of Dravet syndrome. *Journal of Clinical Investigation*, 123(4), 1798–1808.

<https://doi.org/10.1172/JCI66220>

- Kasuya, J., Iyengar, A., Chen, H. L., Lansdon, P., Wu, C. F., & Kitamoto, T. (2019). Milk-whey diet substantially suppresses seizure-like phenotypes of paraShu, a *Drosophila* voltage-gated sodium channel mutant. *Journal of Neurogenetics*, 33(3), 164–178. <https://doi.org/10.1080/01677063.2019.1597082>
- Kazama, H. (2015). Systems neuroscience in *Drosophila*: Conceptual and technical advantages. *Neuroscience*, 296, 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.06.035>
- Kearney, J. A. (2011). Genetic modifiers of neurological disease. *Current Opinion in Genetics and Development*, 21(3), 349–353. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2010.12.007>
- Knipple, D. C., Doyle, K. E., Marsella-Herrick, P. A., & Soderlund, D. M. (1994). Tight genetic linkage between the kdr insecticide resistance trait and a voltage-sensitive sodium channel gene in the house fly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(7), 2483–2487. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.7.2483>
- Kroll, J. R., Wong, K. G., Siddiqui, F. M., & Tanouye, M. A. (2015). Disruption of endocytosis with the dynamin mutant shibirets1 suppresses seizures in *drosophila*. *Genetics*, 201(3), 1087–1102. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.177600>
- Kuijlaars, J., Oyelami, T., Diels, A., Rohrbacher, J., Versweyveld, S., Meneghello, G., Tuefferd, M., Verstraelen, P., Detrez, J. R., Verschuuren, M., De Vos, W. H., Meert, T., Peeters, P. J., Cik, M., Nuydens, R., Brône, B., & Verheyen, A. (2016). Sustained synchronized neuronal network activity in a human astrocyte co-culture system. *Scientific Reports*, 6(October 2016), 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep36529>
- Kumar, M. G., Rowley, S., Fulton, R., Dinday, M. T., Baraban, S. C., & Patel, M. (2016). Altered glycolysis and mitochondrial respiration in a zebrafish model of Dravet

- syndrome. *ENeuro*, 3(2), 1002–1011. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0008-16.2016>
- Lavoy, S., Chittoor-Vinod, V. G., Chow, C. Y., & Martin, I. (2018). Genetic modifiers of neurodegeneration in a drosophila model of parkinson's disease. In *Genetics* (Vol. 209, Issue 4). <https://doi.org/10.1534/genetics.118.301119>
- Leclercq, K., Afrikanova, T., Langlois, M., De Prins, A., Buenafe, O. E., Rospo, C. C., Van Eeckhaut, A., de Witte, P. A. M., Crawford, A. D., Smolders, I., Esguerra, C. V., & Kaminski, R. M. (2015). Cross-species pharmacological characterization of the allylglycine seizure model in mice and larval zebrafish. *Epilepsy and Behavior*, 45, 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.03.019>
- Li, T., & Chen, J. (2018). Voltage-Gated Sodium Channels in Drug Discovery. *Ion Channels in Health and Sickness*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.78256>
- Lin, W. H., & Baines, R. A. (2015). Regulation of membrane excitability: a convergence on voltage-gated sodium conductance. *Molecular Neurobiology*, 51(1), 57–67. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8674-0>
- Lin, W. H., Giachello, C. N. G., & Baines, R. A. (2017). Seizure control through genetic and pharmacological manipulation of Pumilio in Drosophila: A key component of neuronal homeostasis. *DMM Disease Models and Mechanisms*, 10(2), 141–150. <https://doi.org/10.1242/dmm.027045>
- Lin, W. H., He, M., & Baines, R. A. (2015). Seizure suppression through manipulating splicing of a voltage-gated sodium channel. *Brain*, 138(4), 891–901. <https://doi.org/10.1093/brain/awv012>
- Littleton, J. T., & Ganetzky, B. (2000). Ion channels and synaptic organization: Analysis of the Drosophila genome. *Neuron*, 26(1), 35–43. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)81135-6](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81135-6)
- Liu, J., Li, C., Yu, Z., Huang, P., Wu, H., Wei, C., Zhu, N., Shen, Y., Chen, Y., Zhang, B., Deng,

- W. M., & Jiao, R. (2012). Efficient and Specific Modifications of the *Drosophila* Genome by Means of an Easy TALEN Strategy. *Journal of Genetics and Genomics*, 39(5), 209–215. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2012.04.003>
- Lloyd, T. E., & Taylor, J. P. (2010). Flightless flies: *Drosophila* models of neuromuscular disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1184, 1–25. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05432.x>
- Long, Y. S., Zhao, Q. H., Su, T., Cai, Y. L., Zeng, Y., Shi, Y. W., Yi, Y. H., Chang, H. H., & Liao, W. P. (2008). Identification of the promoter region and the 5'-untranslated exons of the human voltage-gated sodium channel Nav1.1 gene (SCN1A) and enhancement of gene expression by the 5'-untranslated exons. *Journal of Neuroscience Research*, 86(15), 3375–3381. <https://doi.org/10.1002/jnr.21790>
- Lopes-Cendes, I., & Oliveira Ribeiro, P. A. (2013). Aspectos genéticos de las epilepsias: una visión actualizada. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 24(6), 909–914. [https://doi.org/10.1016/s0716-8640\(13\)70244-x](https://doi.org/10.1016/s0716-8640(13)70244-x)
- Lopreato, G. F., Lu, Y., Southwell, A., Atkinson, N. S., Hillis, D. M., Wilcox, T. P., & Zakon, H. H. (2001). Evolution and divergence of sodium channel genes in vertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(13), 7588–7592. <https://doi.org/10.1073/pnas.131171798>
- M'Angale, P. G., & Staveley, B. E. (2016). The Bcl-2 homologue Buffy rescues α -synuclein-induced Parkinson disease-like phenotypes in *Drosophila*. *BMC Neuroscience*, 17(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12868-016-0261-z>
- Mahoney, K., Moore, S. J., Buckley, D., Alam, M., Parfrey, P., Penney, S., Merner, N., Hodgkinson, K., & Young, T. L. (2009). Variable neurologic phenotype in a GEFS+ family with a novel mutation in SCN1A. *Seizure*, 18(7), 492–497. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2009.04.009>
- Mantegazza, M., & Broccoli, V. (2019). SCN1A/Nav1.1 channelopathies: Mechanisms in expression systems, animal models, and human iPSC models. *Epilepsia*,

60(S3), S25–S38. <https://doi.org/10.1111/epi.14700>

Manuel de Lera Ruiz, and R. L. K. (2015). Voltage-Gated Sodium Channels : Structure , Function , Pharmacology and Clinical Indications Manuel de Lera Ruiz ,* and Richard L . Kraus. *Journal of Medicinal Chemistry*.

Mao, W., Zhang, J., Körner, H., Jiang, Y., & Ying, S. (2019). The emerging role of voltage-gated sodium channels in tumor biology. *Frontiers in Oncology*, 9(MAR). <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00124>

Marley, R., & Baines, R. A. (2011). Increased persistent Na⁺ current contributes to seizure in the slamdance bang-sensitive *Drosophila* mutant. *Journal of Neurophysiology*, 106(1), 18–29. <https://doi.org/10.1152/jn.00808.2010>

Maroof, A. M., Keros, S., Tyson, J. A., Ying, S. W., Ganat, Y. M., Merkle, F. T., Liu, B., Goulburn, A., Stanley, E. G., Elefanty, A. G., Widmer, H. R., Eggan, K., Goldstein, P. A., Anderson, S. A., & Studer, L. (2013). Directed differentiation and functional maturation of cortical interneurons from human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 12(5), 559–572. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.04.008>

Marshall, G. F., Gonzalez-Sulser, A., & Abbott, C. M. (2021). Modelling epilepsy in the mouse: Challenges and solutions. *DMM Disease Models and Mechanisms*, 14(3). <https://doi.org/10.1242/DMM.047449>

Martin, J. R. (2004). A portrait of locomotor behaviour in *Drosophila* determined by a video-tracking paradigm. *Behavioural Processes*, 67(2), 207–219. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2004.04.003>

Meng, H., Xu, H. Q., Yu, L., Lin, G. W., He, N., Su, T., Shi, Y. W., Li, B., Wang, J., Liu, X. R., Tang, B., Long, Y. S., Yi, Y. H., & Liao, W. P. (2015). The SCN1A Mutation Database: Updating Information and Analysis of the Relationships among Genotype, Functional Alteration, and Phenotype. *Human Mutation*, 36(6), 573–580. <https://doi.org/10.1002/humu.22782>

- Miceli, F., Striano, P., Soldovieri, M. V., Fontana, A., Nardello, R., Robbiano, A., Bellini, G., Elia, M., Zara, F., Tagliatalata, M., & Mangano, S. (2015). A novel KCNQ3 mutation in familial epilepsy with focal seizures and intellectual disability. *Epilepsia*, *56*(2), e15–e20. <https://doi.org/10.1111/epi.12887>
- Miljanovic, N., van Dijk, R. M., Buchecker, V., & Potschka, H. (2021). Metabolomic signature of the Dravet syndrome: A genetic mouse model study. *Epilepsia*, *62*(8), 2000–2014. <https://doi.org/10.1111/epi.16976>
- Miller, A. R., Hawkins, N. A., Mccollom, C. E., & Kearney, J. A. (2014). Mapping genetic modifiers of survival in a mouse model of Dravet syndrome. *Genes, Brain and Behavior*, *13*(2), 163–172. <https://doi.org/10.1111/gbb.12099>
- Mohammad, F., Aryal, S., Ho, J., Stewart, J. C., Norman, N. A., Tan, T. L., Eisaka, A., & Claridge-Chang, A. (2016). Ancient Anxiety Pathways Influence Drosophila Defense Behaviors. *Current Biology*, *26*(7), 981–986. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.02.031>
- Nirwan, N., Vyas, P., & Vohora, D. (2018). Animal models of status epilepticus and temporal lobe epilepsy: A narrative review. *Reviews in the Neurosciences*, *29*(7), 757–770. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2017-0086>
- O'Dowd, D. K., Gee, J. R., & Smith, M. A. (1995). Sodium current density correlates with expression of specific alternatively spliced sodium channel mRNAs in single neurons. *Journal of Neuroscience*, *15*(5 II), 4005–4012. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.15-05-04005.1995>
- Ogiwara, I., Iwasato, T., Miyamoto, H., Iwata, R., Yamagata, T., Mazaki, E., Yanagawa, Y., Tamamaki, N., Hensch, T. K., Itohara, S., & Yamakawa, K. (2013). Nav1.1 haploinsufficiency in excitatory neurons ameliorates seizure-associated sudden death in a mouse model of dravet syndrome. *Human Molecular Genetics*, *22*(23), 4784–4804. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt331>
- Ogiwara, I., Miyamoto, H., Morita, N., Atapour, N., Mazaki, E., Inoue, I., Takeuchi, T.,

- Itohara, S., Yanagawa, Y., Obata, K., Furuichi, T., Hensch, T. K., & Yamakawa, K. (2007). Nav1.1 localizes to axons of parvalbumin-positive inhibitory interneurons: A circuit basis for epileptic seizures in mice carrying an Scn1a gene mutation. *Journal of Neuroscience*, *27*(22), 5903–5914. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5270-06.2007>
- Ohmori, I., Ouchida, M., Kobayashi, K., Jitsumori, Y., Mori, A., Michiue, H., Nishiki, T., Ohtsuka, Y., & Matsui, H. (2013). CACNA1A variants may modify the epileptic phenotype of Dravet syndrome. *Neurobiology of Disease*, *50*(1), 209–217. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.10.016>
- Pandey, U. B., & Nichols, C. D. (2011). Human disease models in drosophila melanogaster and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacological Reviews*, *63*(2), 411–436. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003293>
- Panjwani, N., Wilson, M. D., Addis, L., Crosbie, J., Wirrell, E., Auvin, S., Caraballo, R. H., Kinali, M., McCormick, D., Oren, C., Taylor, J., Trounce, J., Clarke, T., Akman, C. I., Kugler, S. L., Mandelbaum, D. E., McGoldrick, P., Wolf, S. M., Arnold, P., ... Strug, L. J. (2016). A microRNA-328 binding site in PAX6 is associated with centrotemporal spikes of rolandic epilepsy. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, *29*, 512–522. <https://doi.org/10.1002/acn3.320>
- Parker, L., Howlett, I. C., Rusan, Z. M., & Tanouye, M. A. (2011). Seizure and epilepsy: Studies of seizure disorders in drosophila. *International Review of Neurobiology*, *99*, 1–21. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387003-2.00001-X>
- Parker, L., Padilla, M., Du, Y., Dong, K., & Tanouye, M. A. (2011). Drosophila as a model for epilepsy: bss is a gain-of-function mutation in the para sodium channel gene that leads to seizures. *Genetics*, *187*(2), 523–534. <https://doi.org/10.1534/genetics.110.123299>
- Parker, M. D., & Boron, W. F. (2013). The divergence, actions, roles, and relatives of

- sodium-coupled bicarbonate transporters. *Physiological Reviews*, 93(2), 803–959. <https://doi.org/10.1152/physrev.00023.2012>
- Passamonti, C., Petrelli, C., Mei, D., Foschi, N., Guerrini, R., Provinciali, L., & Zamponi, N. (2015). A novel inherited SCN1A mutation associated with different neuropsychological phenotypes: Is there a common core deficit? *Epilepsy and Behavior*, 43, 89–92. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2014.11.009>
- Pearson-Smith, J. N., & Patel, M. (2017). Metabolic dysfunction and oxidative stress in epilepsy. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(11), 1–13. <https://doi.org/10.3390/ijms18112365>
- Pineda-Trujillo, N., Carrizosa, J., Cornejo, W., Arias, W., Franco, C., Cabrera, D., Bedoya, G., & Ruíz-Linares, A. (2005). A novel SCN1A mutation associated with severe GEFS+ in a large South American pedigree. *Seizure*, 14(2), 123–128. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2004.12.007>
- R. Kroll, A. Saras, A. T. et al. (2017). DROSOPHILA SODIUM CHANNEL MUTATIONS: CONTRIBUTIONS TO SEIZURE-SUSCEPTIBILITY. *Physiology & Behavior*, 176(12), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.06.018>.DROSOPHILA
- Radlicz, C., Chambers, A., Olis, E., & Kuebler, D. (2019). The addition of a lipid-rich dietary supplement eliminates seizure-like activity and paralysis in the drosophila bang sensitive mutants. *Epilepsy Research*, 155(May 2019), 106153. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2019.106153>
- Rahit, K. M. T. H., & Tarailo-Graovac, M. (2020). Genetic Modifiers and Rare Mendelian Disease. *Genes*, 11(3). <https://doi.org/10.3390/genes11030239>
- Ravenswaaij-arts, C. M. Van, Hefner, M., Blake, K., & Martin, D. M. (2021). *CHD7 Disorder Summary Genetic counseling GeneReview Scope Diagnosis Suggestive Findings*. 1–31.
- Ren, D., Navarro, B., Xu, H., Yue, L., Shi, Q., & Clapham, D. E. (2001). A prokaryotic voltage-

- gated sodium channel. *Science*, 294(5550), 2372–2375. <https://doi.org/10.1126/science.1065635>
- Reynolds, E. R. (2018). Shortened lifespan and other age-related defects in bang sensitive mutants of drosophila melanogaster. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 8(12), 3953–3960. <https://doi.org/10.1534/g3.118.200610>
- Rhodes, T. H., Lossin, C., Vanoye, C. G., Wang, D. W., & George, A. L. (2004). Noninactivating voltage-gated sodium channels in severe myoclonic epilepsy of infancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(30), 11147–11152. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402482101>
- Richards, K. L., Milligan, C. J., Richardson, R. J., Jancovski, N., Grunnet, M., Jacobson, L. H., Undheim, E. A. B., Mobli, M., Chow, C. Y., Herzig, V., Csoti, A., Panyi, G., Reid, C. A., King, G. F., & Petrou, S. (2018). Selective NaV1.1 activation rescues Dravet syndrome mice from seizures and premature death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(34), E8077–E8085. <https://doi.org/10.1073/pnas.1804764115>
- Ricobaraza, A., Mora-Jimenez, L., Puerta, E., Sanchez-Carpintero, R., Mingorance, A., Artieda, J., Nicolas, M. J., Besne, G., Bunuales, M., Gonzalez-Aparicio, M., Sola-Sevilla, N., Valencia, M., & Hernandez-Alcoceba, R. (2019). Epilepsy and neuropsychiatric comorbidities in mice carrying a recurrent Dravet syndrome SCN1A missense mutation. *Scientific Reports*, 9(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50627-w>
- Rivadulla, C., Aguilar, J., Coletti, M., Aguila, J., Prieto, S., & Cudeiro, J. (2018). Static magnetic fields reduce epileptiform activity in anesthetized rat and monkey. *Scientific Reports*, 8(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33808-x>
- Sato, C., Ueno, Y., Asai, K., Takahashi, K., Sato, M., Engel, A., & Fujiyoshi, Y. (2001). The voltage-sensitive sodium channel is a bell-shaped molecule with several cavities. *Nature*, 409(6823), 1047–1051. <https://doi.org/10.1038/35059098>

- Schutte, R. J., Schutte, S. S., Algara, J., Barragan, E. V., Gilligan, J., Staber, C., Savva, Y. A., Smith, M. A., Reenan, R., & O'Dowd, D. K. (2014). Knock-in model of Dravet syndrome reveals a constitutive and conditional reduction in sodium current. *Journal of Neurophysiology*, *112*(4), 903–912. <https://doi.org/10.1152/jn.00135.2014>
- Schutte, S. S., Schutte, R. J., Barragan, E. V., & O'Dowd, D. K. (2016). Model systems for studying cellular mechanisms of SCN1A-related epilepsy. *Journal of Neurophysiology*, *115*(4), 1755–1766. <https://doi.org/10.1152/jn.00824.2015>
- Seugnet, L., Suzuki, Y., Stidd, R., & Shaw, P. J. (2009). Aversive phototactic suppression: Evaluation of a short-term memory assay in *Drosophila melanogaster*. *Genes, Brain and Behavior*, *8*(4), 377–389. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2009.00483.x>
- Singh, N. A., Pappas, C., Dahle, E. J., Claes, L. R. F., Pruess, T. H., De Jonghe, P., Thompson, J., Dixon, M., Gurnett, C., Peiffer, A., White, H. S., Filloux, F., & Leppert, M. F. (2009). A role of SCN9A in human epilepsies, as a cause of febrile seizures and as a potential modifier of Dravet syndrome. *PLoS Genetics*, *5*(9), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000649>
- Song, J., & Tanouye, M. A. (2008). From bench to drug: Human seizure modeling using *Drosophila*. *Progress in Neurobiology*, *84*(2), 182–191. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2007.10.006>
- Spafford, J. D., Spencer, A. N., & Gallin, W. J. (1998). A putative voltage-gated sodium channel α subunit (PpSCN1) from the hydrozoan jellyfish, *Polyorchis penicillatus*: Structural comparisons and evolutionary considerations. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *244*(3), 772–780. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8332>
- St Johnston, D. (2002). The art and design of genetic screens: *Drosophila melanogaster*. *Nature Reviews Genetics*, *3*(3), 176–188.

<https://doi.org/10.1038/nrg751>

- Stafstrom, C. E. (2007). Persistent Sodium Current and Its Role in Epilepsy. *Epilepsy Currents*, 7(1), 15–22. <https://doi.org/10.1111/j.1535-7511.2007.00156.x>
- Steel, D., Symonds, J. D., Zuberi, S. M., & Brunklaus, A. (2017). Dravet syndrome and its mimics: Beyond SCN1A. *Epilepsia*, 58(11), 1807–1816. <https://doi.org/10.1111/epi.13889>
- Stein, R. E., Kaplan, J. S., Li, J., & Catterall, W. A. (2019). Hippocampal deletion of NaV1.1 channels in mice causes thermal seizures and cognitive deficit characteristic of Dravet Syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(33), 16571–16576. <https://doi.org/10.1073/pnas.1906833116>
- Steinlein, O. K. (2014). Mechanisms underlying epilepsies associated with sodium channel mutations. In *Progress in Brain Research* (1st ed., Vol. 213, Issue C). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63326-2.00005-3>
- Stewart, B. A., Atwood, H. L., Renger, J. J., Wang, J., & Wu, C. F. (1994). Improved stability of *Drosophila* larval neuromuscular preparations in haemolymph-like physiological solutions. *Journal of Comparative Physiology A*, 175(2), 179–191. <https://doi.org/10.1007/BF00215114>
- Stühmer, W., Conti, F., Suzuki, H., Wang, X., Noda, M., Yahagi, N., Kubo, H., & Numa, S. (1989). Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature*, 339(6226), 597–603. <https://doi.org/10.1038/339597a0>
- Suls, A., Velizarova, R., Yordanova, I., Deprez, L., Van Dyck, T., Wauters, J., Guergueltcheva, V., Claes, L. R. F., Kremensky, I., Jordanova, A., & De Jonghe, P. (2010). Four generations of epilepsy caused by an inherited microdeletion of the SCN1A gene. *Neurology*, 75(1), 72–76. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181e62088>

- Sun, L., Gilligan, J., Staber, C., Schutte, R. J., Nguyen, V., O'Dowd, D. K., & Reenan, R. (2012). A knock-in model of human epilepsy in *Drosophila* reveals a novel cellular mechanism associated with heat-induced seizure. *Journal of Neuroscience*, *32*(41), 14146–14155. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2932-12.2012>
- Surovy, M., Soltysova, A., Kolnikova, M., Sykora, P., Ilencikova, D., Ficek, A., Radvanszky, J., & Kadasi, L. (2016). *Novel SCN1A variants in Dravet syndrome and evaluating a wide approach of patient selection*. 333–342. <https://doi.org/10.4149/gpb>
- Tai, C., Abe, Y., Westenbroek, R. E., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (2014). Impaired excitability of somatostatin- and parvalbumin-expressing cortical interneurons in a mouse model of Dravet syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(30), 3139–3148. <https://doi.org/10.1073/pnas.1411131111>
- Tapia, A., Giachello, C. N., Palomino-Schätzlein, M., Baines, R. A., & Galindo, M. I. (2021). Generation and characterization of the *drosophila melanogaster* paralytic gene knock-out as a model for dravet syndrome. *Life*, *11*(11). <https://doi.org/10.3390/life11111261>
- Thackeray, J. R., & Ganetzky, B. (1994). Developmentally regulated alternative splicing generates a complex array of *Drosophila para* sodium channel isoforms. *Journal of Neuroscience*, *14*(5 1), 2569–2578. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.14-05-02569.1994>
- Thompson, P. J., Mitchell, T. N., Free, S. L., Williamson, K. A., Hanson, I. M., Van Heyningen, V., Moore, A. T., & Sisodiya, S. M. (2004). Cognitive functioning in humans with mutations of the PAX6 gene. *Neurology*, *62*(7), 1216–1218. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000118298.81140.62>
- Tiraboschi, E., Martina, S., van der Ent, W., Grzyb, K., Gawel, K., Cordero-Maldonado, M. L., Poovathingal, S. K., Heintz, S., Satheesh, S. V., Brattespe, J., Xu, J., Suster, M., Skupin, A., & Esguerra, C. V. (2020). New insights into the early mechanisms of

- epileptogenesis in a zebrafish model of Dravet syndrome. *Epilepsia*, 61(3), 549–560. <https://doi.org/10.1111/epi.16456>
- Trujillo, C. A., Gao, R., Negraes, P. D., Gu, J., Buchanan, J., Preissl, S., Wang, A., Wu, W., Haddad, G. G., Chaim, I. A., Domissy, A., Vandenberghe, M., Devor, A., Yeo, G. W., Voytek, B., & Muotri, A. R. (2019). Complex Oscillatory Waves Emerging from Cortical Organoids Model Early Human Brain Network Development. *Cell Stem Cell*, 25(4), 558-569.e7. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.08.002>
- Ugur, B., Chen, K., & Bellen, H. J. (2016). Drosophila tools and assays for the study of human diseases. *DMM Disease Models and Mechanisms*, 9(3), 235–244. <https://doi.org/10.1242/dmm.023762>
- Xie, H. B., & Golic, K. G. (2004). Gene deletions by ends-in targeting in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 168(3), 1477–1489. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.030882>
- Xie, Y., Ng, N. N., Safrina, O. S., Ramos, C. M., Ess, K. C., Schwartz, P. H., Smith, M. A., & Dowd, D. K. O. (2020). Neurobiology of Disease Comparisons of dual isogenic human iPSC pairs identify functional alterations directly caused by an epilepsy associated SCN1A mutation. *Neurobiology of Disease*, 134(September 2019), 104627. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104627>
- Yu, F. H., & Catterall, W. A. (2003). Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biology*, 4(3). <https://doi.org/10.1186/gb-2003-4-3-207>
- Yu, F. H., Mantegazza, M., Westenbroek, R. E., Robbins, C. A., Kalume, F., Burton, K. A., Spain, W. J., McKnight, G. S., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (2006). Reduced sodium current in GABAergic interneurons in a mouse model of severe myoclonic epilepsy in infancy. *Nature Neuroscience*, 9(9), 1142–1149. <https://doi.org/10.1038/nn1754>
- Yuan, F., Chen, X., Fang, K. H., Wang, Y., Lin, M., Xu, S. B., Huo, H. Q., Xu, M., Ma, L., Chen, Y., He, S., & Liu, Y. (2018). Induction of human somatostatin and parvalbumin

- neurons by expressing a single transcription factor LIM homeobox 6. *ELife*, 7, 1–18. <https://doi.org/10.7554/eLife.37382>
- Yue, C., Remy, S., Su, H., Beck, H., & Yaari, Y. (2005). Proximal persistent Na⁺ channels drive spike afterdepolarizations and associated bursting in adult CA1 pyramidal cells. *Journal of Neuroscience*, 25(42), 9704–9720. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1621-05.2005>
- Zafeiriou, M. P., Bao, G., Hudson, J., Halder, R., Blenkle, A., Schreiber, M. K., Fischer, A., Schild, D., & Zimmermann, W. H. (2020). Developmental GABA polarity switch and neuronal plasticity in Bioengineered Neuronal Organoids. *Nature Communications*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17521-w>
- Zeng, T., Dong, Z. F., Liu, S. J., Wan, R. P., Tang, L. J., Liu, T., Zhao, Q. H., Shi, Y. W., Yi, Y. H., Liao, W. P., & Long, Y. S. (2014). A novel variant in the 3' UTR of human SCN1A gene from a patient with Dravet syndrome decreases mRNA stability mediated by GAPDH's binding. *Human Genetics*, 133(6), 801–811. <https://doi.org/10.1007/s00439-014-1422-8>
- Zhang, Y., Pak, C., Han, Y., Ahlenius, H., Zhang, Z., Marro, S., Patzke, C., Acuna, C., Covy, J., Yang, N., Danko, T., Chen, L., Wernig, M., Thomas, C., & Drive, C. (2013). *NIH Public Access*. 78(5), 785–798. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.05.029>.Rapid

Páginas web:

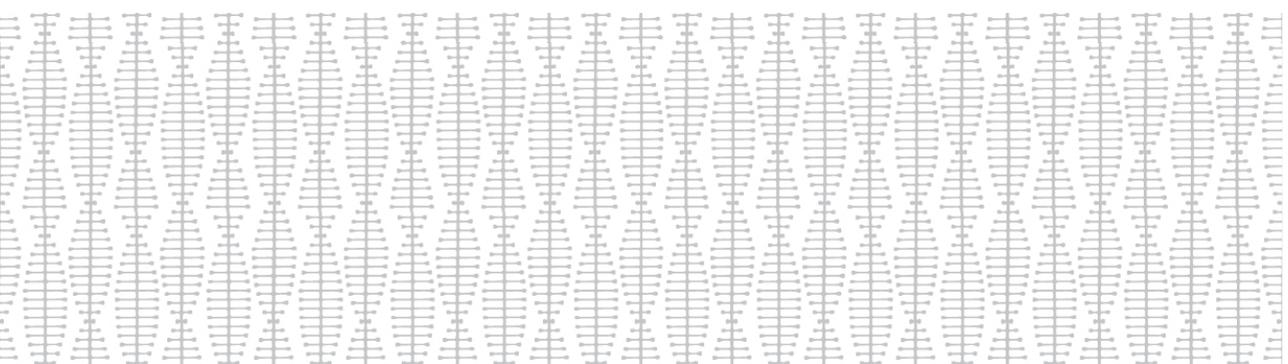
Apoyo Dravet (2017). Qué es el Síndrome de Dravet. Visto el 12 de noviembre de 2021.

UNIPROT (2021). SCN1A. Visto el 15 de octubre de 2021.

The Laboratory Jackson (2021). SCN1A. Visto el 18 de diciembre de 2021.

ORPHANET (2021). Síndrome de Dravet. Visto el 26 de marzo de 2022.

Anexos



Anexos

Nombre	Secuencia	Dirección	Uso
Brazo A	AGAG <u>GCTAGCC</u> AGTATTCGGGCAACTGCTG	Directo	Generación <i>para</i> ^{KO}
Brazo A	AGAG <u>AGGTACCT</u> GTCTATGCGGCCAACGATGA	Inverso	Generación <i>para</i> ^{KO}
Brazo B	AGAGA <u>ACTAGT</u> TCCGACTCGATATCTGAGGAAG	Directo	Generación <i>para</i> ^{KO}
Brazo B	GTGGACATATGCTGTTCTAGT	Inverso	Generación <i>para</i> ^{KO}
Nested Brazo A	GCATCCGTAGTCACTGCAACT	Directo	Generación <i>para</i> ^{KO}
Nested Brazo A	CAGTTACTGATACAGATACAGAA	Inverso	Generación <i>para</i> ^{KO}
Validación Brazo A	TCGCTGGTGGTAG	Directo	Validación <i>para</i> ^{KO}
Validación Brazo A	CGAAGTTATGGTACACT	Inverso	Validación <i>para</i> ^{KO}
Validación Brazo B	ATAGGAAGTTATCACTAGTTCCG	Directo	Validación <i>para</i> ^{KO}
Validación Brazo B	GACAGAATAGACAGTATGCAG	Inverso	Validación <i>para</i> ^{KO}
PCRc validación KO	CTGAACATGAAAAGCAGAAGG	Directo	Validación <i>para</i> ^{KO}
PCRc validación KO	CCTGTTCAAGTGTAGGATCCG	Inverso	Validación <i>para</i> ^{KO}
Validación escisión	CGAAGATGAGGAAGACACAT	Directo	Validación <i>para</i> ^{KO}
Validación escisión	GACAGAATAGACAGTATGCAG	Inverso	Validación <i>para</i> ^{KO}
rp49	CGTTTACTGCGGCGAGAT	Directo	Control interno PCRc
rp49	GCGCTCGACAATCTCCTT	Inverso	Control interno PCRc

cac	TGACTGGATCACACAAGCAG	Directo	PCRc modificadores
cac	CATTATGTGCATTTTCTCTTCTCC	Inverso	PCRc modificadores
CIC	CGAGATCGAGGCGTTCTACT	Directo	PCRc modificadores
CIC-a	CGTCGCTTTTCGAGTATTTTG	Inverso	PCRc modificadores
KCNQ	CGTCCGTGGAGAATCTGG	Directo	PCRc modificadores
KCNQ	TATGAACCTGATGGCGGTCT	Inverso	PCRc modificadores
nAChRa1	CGTTTCAGCGGCGACTAC	Directo	PCRc modificadores
nAChRa1	AGCCAAATCGAAGCGATG	Inverso	PCRc modificadores
nAChRa4	AAAAGAAGATTTATCGCAAAGCA	Directo	PCRc modificadores
nAChRa4	CTGGGCCATGAACCTGAC	Inverso	PCRc modificadores
toy	AACGGTTGCGTAAGCAAAT	Directo	PCRc modificadores
toy	TCGAGGTTTTATCGATCCAGTT	Inverso	PCRc modificadores

Tabla 5. Cebadores empleados durante el trabajo.

Nombre	Genotipo	Origen	Uso
OrR	<i>Oregón R</i>	BDSC#2371	Cepa salvaje
white ¹¹¹⁸	<i>white</i> ⁻	BDSC#3605	Cepa salvaje
cs	<i>Canton-S</i>	BDSC#64349	Cepa salvaje
If/Cyo;TM6B/MKRS	<i>w; If/Cyo;TM6B/MKRS</i>	BDSC#68897	Generación de cepas
KO <i>para</i>	<i>w</i> ¹¹¹⁸ , <i>para</i> ^{KO} / <i>w</i> ,+	Generada en el laboratorio	Experimental Capítulos I y II
Control	<i>w</i> ¹¹¹⁸ , <i>para</i> ⁺ / <i>w</i> ,+	Generada en el laboratorio	Control Capítulos I y II
KO <i>para</i> /FM7	<i>para</i> ^{KO} /FM7c GFP	Generada en el laboratorio	Validación KO
Ubi-Gal4	<i>ubiquitin-Gal4[3xP3-GFP]</i>	Luis Alberto Baena-López	Generación KO
HsCre	<i>HsCre;TM2/TM6B</i>	BDSC#6936	Generación KO
Hs-FLP, hs-I-Scel	<i>y[1]w[*]/Dp(2;Y)G, P{w[+mC]=hs-hid}Y; P{ry[+t7.2]=70FLP}23 P{v[+t1.8]=70I-Scel}4A/TM3, P{w[+mC]=hs-hid}14, Sb[1]</i>	BDSC#25679	Generación KO
Deficiencia <i>para</i>	<i>Df(1)EDD-0230908,w[1118]/FM7c</i>	BDSC#23296	Electrofisiología KO

<i>para^{bss1}/ elavGal4</i>	<i>para^{bss1}/para^{bss1};elavGal4/Cyo</i>	Generada en el laboratorio	Búsqueda de modificadores
ARNi cac	<i>y1 v1; P{y+t7.7 v+t1.8=TRiP.JF02572}attP2</i>	BDSC#27244	Búsqueda de modificadores
ARNi CIC- α	<i>y1 sc* v1; P{y+t7.7 v+t1.8=TRiP.HMC03566}attP40/CyO</i>	BDSC#5333	Búsqueda de modificadores
ARNi KCNQ	<i>y1 v1; P{y+t7.7 v+t1.8=TRiP.JF02562}attP2</i>	BDSC#27252	Búsqueda de modificadores
ARNi nAChR α 1	<i>y1 v1; P{y+t7.7 v+t1.8=TRiP.JF03103}attP2</i>	BDSC#28688	Búsqueda de modificadores
ARNi nAChR α 4	<i>y1 v1; P{y+t7.7 v+t1.8=TRiP.JF03419}attP2</i>	BDSC#31985	Búsqueda de modificadores
ARNi toy	<i>y1 sc* v1; P{y+t7.7 v+t1.8=TRiP.HMS00544}attP2</i>	BDSC#33679	Búsqueda de modificadores
ARNi vacío	<i>y1v1;P{y+t7.7=nosphiC31\int.NLS}X; P{y+t7.7=CaryP}attP40</i>	BDSC#25709	Búsqueda de modificadores

Tabla 6. Cepas empleadas durante la elaboración de este trabajo. Bloomington Drosophila Stock Center (BDSC); Universitat de València (UV).