



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior  
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica  
y del Medio Natural

Evaluación de inhibidores de ferroptosis como tratamiento  
para la Ataxia de Friedreich en modelos de *Drosophila*  
*melanogaster*

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Abellán Soriano, Adrián

Tutor/a: Galindo Orozco, Máximo Ibo

Cotutor/a externo: NAVARRO LANGA, JUAN ANTONIO

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Escuela Técnica Superior  
de Ingeniería Agronómica  
y del Medio Natural

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA**

**ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D' ENGINYERIA AGRONÒMICA Y DEL MEDI NATURAL**

***TRABAJO FIN DE GRADO***

---

Evaluación de inhibidores de ferroptosis como  
tratamiento para la ataxia de Friedreich en  
modelos de *Drosophila melanogaster*

---

**GRADO EN BIOTECNOLOGÍA**

Alumno: Adrián Abellán Soriano

Tutor académico: Prof. D. Máximo Ibo Galindo

Cotutor externo: D. Juan Antonio Navarro Langa

Curso académico 2022-2023

Valencia, julio de 2023

## **Evaluation of ferroptosis inhibitors as treatment for Friedreich's Ataxia in *Drosophila melanogaster* models.**

### **Abstract**

Friedreich's ataxia (FRDA) is a multisystem neurodegenerative disorder, inherited in an autosomal recessive manner, caused by the hyperexpansion of the GAA triplet in the gene encoding frataxin, a mitochondrial protein involved in the synthesis of iron-sulphur clusters and antioxidant defences. Depletion of frataxin leads to iron accumulation in the mitochondria, uncontrolled production of reactive oxygen species and lipid peroxidation. These features are common to ferroptosis, a form of iron-dependant cell death that arises from the accumulation of peroxidized lipids when glutathione-dependant repair systems are compromised. However, ferroptosis in FRDA has only been studied *in vitro* cellular models, so it is necessary to study it in complex multicellular organisms such as *Drosophila melanogaster* to confirm the hypothesis that it is the type of cell death that occurs in FRDA. The fruit fly contains a homologous gene to frataxin in its genome, so its expression can be modulated using the RNAi system, thus obtaining an animal model with the neurological and neuromuscular manifestations typical of patients with FRDA.

Currently, there is no cure for FRDA, but exciting therapeutic developments focusing on different parts of the pathological cascade are emerging. This study demonstrates that the use of ferroptosis inhibitors drugs such as N-acetylcysteine and N-acetylcysteine amide, which introduce cysteine into the cell, improves locomotion, survival, mitochondrial activity and neurodegeneration in frataxin-deficient flies. Similarly, the co-expression of *mGPX1* has a protective effect in our frataxin models, mainly by increasing antioxidant defences, hypothetically decreasing the amount of lipid peroxides. Thus, our results clearly support the involvement of ferroptosis in FRDA, with apoptosis being a secondary factor.

This work relates to the 2023 Agenda's SDG 3: good health and well-being.

**Keywords:** *Drosophila melanogaster*; ferroptosis; Friedreich's ataxia; lipids, N-acetylcysteine; neurodegeneration; *mGPX1*

**Author:** Adrián Abellán Soriano

**Academic tutor:** Prof. D. Máximo Ibo Galindo

**External tutor:** D. Juan Antonio Navarro Langa

# Evaluación de inhibidores de ferroptosis como tratamiento para la ataxia de Friedreich en modelos de *Drosophila melanogaster*

## Resumen

La ataxia de Friedreich (AF) es un trastorno neurodegenerativo multisistémico, de herencia autosómica recesiva, causado por la hiperexpansión del triplete GAA en el gen que codifica para la frataxina, una proteína mitocondrial involucrada en la síntesis de grupos de hierro-azufre y en las defensas antioxidantes. El agotamiento de frataxina conlleva la acumulación de hierro en la mitocondria, la producción descontrolada de especies reactivas de oxígeno y peroxidación lipídica. Estas características son comunes a la ferroptosis, forma de muerte celular dependiente del hierro que surge de la acumulación de lípidos peroxidados cuando los sistemas de reparación dependientes de glutatión están comprometidos. No obstante, la ferroptosis en la AF únicamente ha sido estudiada en modelos celulares *in vitro*, por lo que es necesario su estudio en organismos complejos pluricelulares como *Drosophila melanogaster* para corroborar la hipótesis de que es el tipo de muerte celular que ocurre en la AF. La mosca de la fruta contiene en su genoma un gen homólogo a la frataxina, por lo que mediante el sistema de ARNi se puede modular su expresión, obteniendo así un modelo animal con las manifestaciones neurológicas y neuromusculares propias de pacientes con la AF.

Actualmente no existe una cura para la AF, pero se vislumbran emocionantes desarrollos terapéuticos que se enfocan en diferentes partes de la cascada patológica. En este estudio se demuestra que el empleo de fármacos inhibidores de ferroptosis como N-acetilcisteína y N-acetilcisteína amida, que introducen cisteína al interior celular, permiten mejorar la locomoción, supervivencia, la actividad mitocondrial y la neurodegeneración de moscas deficientes en frataxina. Del mismo modo, la coexpresión de *mGPX1* tiene un efecto protector en nuestros modelos de frataxina, principalmente al incrementar la defensa antioxidante, hipotéticamente disminuyendo la cantidad de peróxidos lipídicos. Así, nuestros resultados respaldan claramente la participación de la ferroptosis en la AF, siendo la apoptosis un factor secundario.

Este trabajo se relaciona con los siguientes ODS de la Agenda 2030: ODS 3. Salud y Bienestar.

**Palabras clave:** Ataxia de Friedreich; *Drosophila melanogaster*; ferroptosis; lípidos; N-acetilcisteína; neurodegeneración; *mGPX1*.

**Autor:** Adrián Abellán Soriano

**Tutor académico:** Prof. D. Máximo Ibo Galindo

**Cotutor externo:** D. Juan Antonio Navarro Langa

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, agradecer a Juan Antonio por acogerme en su laboratorio y sobre todo por su cercanía y amabilidad. Ha sido una experiencia inolvidable, tanto en lo profesional como en las amistades que he hecho y los momentos compartidos. Gracias a todos por ayudar a formarme como científico y generar un ambiente en el que trabajar era mucho más fácil.

También me gustaría agradecer a todas esas personas que me han ayudado a progresar y a sacar adelante todos los retos que se me presentaban. Gracias a Carlos y Marc por ser mis apoyos durante estos 4 años de carrera y lo mucho que nos queda por vivir juntos. Gracias a Manu y Gloria por ayudarme en los momentos más difíciles y disfrutar la vida conmigo. Gracias a Claudia por ser mi compañera de viaje y saber escuchar y apostar por mí en los momentos en los que ni siquiera yo lo hago. Gracias a Alberto y Alejandro por vuestro humor, con vosotros no hay hueco para la tristeza. En definitiva gracias a todas las personas que me han acompañado durante estos años y que han hecho de este uno de los mejores momentos de mi vida.

Por último, quiero agradecer a mis padres Amparo y José Luis por confiar en mí, apoyarme en todas mis decisiones y hacer lo imposible con tal de darme la oportunidad de aprender, os lo debo todo. Gracias a mis hermanas Lorena y Sara por ser mi otra mitad, con vosotras la vida es mucho más fácil. Gracias a mis abuelos por inspirarme a trabajar duro para conseguir mis metas y a los que me miran desde el cielo, no os olvidaré nunca.

Gracias a todos por convertirme en la persona que soy.

# ÍNDICE GENERAL

<b>1. Introducción</b> .....	1
1.1. Etiopatogenia de la ataxia de Friedreich .....	1
1.1.1. Funciones de la frataxina.....	2
1.1.2. Ferroptosis como causa de muerte celular en AF .....	3
1.2. Modelos de <i>Drosophila</i> para el estudio de la Ataxia de Friedreich .....	5
1.3. Inhibidores de ferroptosis como tratamiento de la AF .....	7
<b>2. Objetivo</b> .....	8
<b>3. Materiales y métodos</b> .....	9
3.1. Mantenimiento y <i>stocks</i> de <i>Drosophila</i> .....	9
3.2. Tratamientos farmacológicos .....	10
3.3. Análisis de la expresión génica .....	10
3.3.1. Extracción de ARN .....	10
3.3.2. Síntesis de ADNc.....	11
3.3.3. PCR semicuantitativa a tiempo real.....	11
3.4. Cuantificación de los niveles de ATP .....	12
3.4.1. Preparación de la muestra.....	12
3.4.2. Ensayo de la luciferasa .....	12
3.4.3. Ensayo <i>Bradford</i> .....	13
3.5. Inmunohistoquímica.....	13
3.6. Secciones de cerebros en parafina.....	13
3.7. Ensayo de longevidad .....	14
3.8. Ensayo de geotaxis negativa.....	14
3.9. Análisis estadísticos .....	14
<b>4. Resultados</b> .....	15
4.1. La apoptosis no es la principal ruta de muerte celular en modelos de AF en <i>D. melanogaster</i> .....	15
4.2. La inhibición genética de la ferroptosis rescata la fisiología en modelos de AF en <i>D. melanogaster</i> .....	16
4.3. Efecto de la inhibición farmacológica de la ferroptosis sobre los fenotipos asociados a la falta de frataxina .....	19
4.4. No hay disminución en la cantidad de lípidos cerebrales con la inhibición farmacológica y genética de la ferroptosis.....	23
<b>5. Discusión</b> .....	25

6. <b>Conclusiones</b> .....	30
7. <b>Bibliografía</b> .....	31
8. <b>Anexo</b> .....	40

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> <i>Stocks</i> de <i>Drosophila</i> .....	9
<b>Tabla 2.</b> Cruces de <i>Drosophila melanogaster</i> realizados y nomenclatura de la descendencia empleada.....	9, 10
<b>Tabla 3.</b> Volúmenes y reactivos necesarios para la retrotranscripción del ARN a ADNc.....	11
<b>Tabla 4.</b> Composición de la reacción RT-qPCR.....	12
<b>Tabla A1.</b> Secuencia de los cebadores utilizados en la PCR semicuantitativa.....	40
<b>Tabla A2.</b> Objetivos de Desarrollo Sostenibles y su relación con la investigación de la AF.....	41

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Descripción general de las alteraciones observadas en la ataxia de Friedreich tras la deficiencia de expresión de frataxina y su asociación con la ferroptosis (elaboración propia, creada con Biorender.com).....	5
<b>Figura 2.</b> El sistema GAL4/UAS es utilizado en <i>Drosophila melanogaster</i> para suprimir la expresión de frataxina, generando un modelo animal <i>in vivo</i> de AF para estudiar la enfermedad (adaptada de Calap-Quintana <i>et al.</i> (2018), creado con BioRender.com).....	7
<b>Figura 3.</b> Análisis de la expresión relativa de genes apoptóticos.....	16
<b>Figura 4.</b> Efecto de la coexpresión de <i>mGPX1</i> en moscas modelo de AF con deficiencia ubicua de frataxina.....	18
<b>Figura 5.</b> Efecto de la coexpresión de <i>mGPX1</i> en moscas con reducción panglial de frataxina.....	19
<b>Figura 6.</b> Los tratamientos farmacológicos recuperan algunos de los síntomas causados por la AF en moscas modelo con interferencia sistémica de frataxina.....	22
<b>Figura 7.</b> Efecto del tratamiento farmacológico en moscas con reducción panglial de frataxina.....	23
<b>Figura 8.</b> La cantidad de lípidos neutros no es disminuida con el tratamiento farmacológico y genético de los modelos de AF con reducción de frataxina en la glía.....	24
<b>Figura A1.</b> Análisis de la coexpresión de <i>mGPX1</i> en moscas sin deficiencia de frataxina.....	40

## ABREVIATURAS

<b>ADNc</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario
<b>AF</b>	Ataxia de Friedreich
<b>ARE</b>	Elemento de respuesta antioxidante
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNi</b>	ARN de interferencia
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>CFS</b>	Centros de hierro-azufre
<b>Ct</b>	Ciclo umbral
<b>FRDA</b>	Friedreich's ataxia
<b>GPx</b>	Glutation peroxidasas
<b>GPX4</b>	Glutación peroxidasa 4
<b>GSH</b>	Glutación
<b>GTPX1</b>	Glutación tiorredoxina peroxidasa 1
<b>MDA</b>	Malondialdehído
<b>mGPX1</b>	Glutación peroxidasa 1 de ratón
<b>NAC</b>	N-acetilcisteína
<b>NACa</b>	N-acetilcisteína amida
<b>Nf</b>	Comida normal
<b>NRF2</b>	Factor nuclear eritroide 2
<b>ODS</b>	Objetivo de desarrollo sostenible
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>Rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>RT</b>	Retrotranscripción
<b>TA</b>	Temperatura ambiente

# 1. INTRODUCCIÓN

La ataxia de Friedreich (AF) es una enfermedad grave de los sistemas nerviosos central y periférico que se manifiesta únicamente en poblaciones Indo-Europeas y Afro-Asiáticas (Labuda *et al.*, 2000). Las estadísticas muestran que es la ataxia hereditaria más común entre las personas de ascendencia europea, con aproximadamente 1 de cada 20.000 o 1 de cada 50.000 personas afectadas. No obstante, la prevalencia depende de la región del continente, ya que en el sur y oeste de Europa el número de pacientes es de 1 de cada 20.000, mientras que en el norte y este de Europa la prevalencia oscila entre 1 de cada 125.000 personas (Vankan, 2013). Además, se estima que la frecuencia de ser portadores de un alelo mutado es entre 1:60 y 1:100 (Parkinson *et al.*, 2013).

El cuadro clínico de los pacientes que padecen la AF consiste en manifestaciones neurológicas y neuromusculares, entre las que destacan principalmente la ataxia progresiva de las extremidades y la marcha, disartria, debilidad muscular y la pérdida sensorial. A nivel neurológico, conlleva la degeneración de los axones de las neuronas sensoriales de los ganglios de la raíz dorsal, de los núcleos dentados del cerebelo y las columnas posteriores, así como una gran debilidad motora superior debido a la degeneración de los tractos espinocerebelosos de la médula espinal. Otros signos clínicos no neurológicos son los asociados a defectos en el esqueleto, miocardiopatía y una mayor tasa de diabetes mellitus (Koeppen & Mazurkiewicz, 2013; Delatycki & Bidichandani, 2019). Los primeros síntomas suelen aparecer antes de los 25 años y los pacientes pierden la capacidad locomotora aproximadamente 10 o 15 años después de desarrollar la enfermedad (Tsou *et al.*, 2011). Además, la esperanza de vida se reduce notablemente, siendo el tiempo medio desde el inicio hasta la muerte de 36 años. La principal causa de muerte es la miocardiopatía, ya que la AF provoca hipertrofia de los cardiomiocitos y fibrosis endomisial extensa debido a una acumulación excesiva de hierro (Koeppen *et al.*, 2015).

También han sido descritas otras variantes de AF que aparecen de forma más tardía, a partir de los 25 y 40 años, y que presentan un fenotipo menos severo y una progresión más lenta de la enfermedad. Por ejemplo, en estos casos la disartria aparece más tarde y la miocardiopatía y la diabetes son menos frecuentes (Lecocq *et al.*, 2015).

## 1.1. Etiopatogenia de la ataxia de Friedreich

La AF es una enfermedad autosómica recesiva causada principalmente por mutaciones en el gen *FXN*. El gen *FXN* es responsable de la producción de la proteína frataxina, la cual está asociada con la membrana interna de las mitocondrias. La mayoría de los pacientes presentan en homocigosis una expansión inestable del trinucleótido GAA en el intrón 1 del gen de la frataxina (Campuzano *et al.*, 1996). Sin embargo, una pequeña minoría de casos (entre el 2-4 %) presentan expansiones GAA heterocigotas, en los que únicamente uno de los alelos presenta las hiperexpansiones de GAA en el

gen *FXN* y el otro alelo presenta una mutación puntual (Cossée *et al.*, 1999). El número de repeticiones de trinucleótidos en cromosomas normales es alrededor de 40 y el umbral patológico a partir del cual se desarrolla la enfermedad suele ser de 70 repeticiones, siendo de 600 y 900 el número de repeticiones patológicas más habitual entre los pacientes con AF (Cook & Giunti, 2017). Además existe una relación genotipo-fenotipo ya que la longitud de expansión del triplete GAA se correlaciona con la edad en la que comienza a manifestarse la enfermedad, y por lo tanto, con su severidad y mortalidad. El número de repeticiones y la cantidad de ARNm producido mantienen una relación inversa entre sí (Lecocq *et al.*, 2015).

La expansión intrónica de los trinucleótidos GAA por encima de lo normal causa una deficiencia en la iniciación transcripcional del gen *FXN* que resulta en niveles anormalmente bajos de la proteína frataxina, siendo la causa molecular de la enfermedad (Bidichandani *et al.*, 1998). Se ha realizado una extensa investigación sobre los mecanismos responsables de este efecto de inhibición, con la esperanza de que abordar esta alteración genética inicial pueda ofrecer una estrategia efectiva para modificar la enfermedad (Cook & Giunti, 2017). Algunos estudios muestran que la repetición GAA expandida forma estructuras no canónicas como bucles R y tripletes de ADN “pegajoso” que bloquean físicamente la transcripción, impidiendo el progreso de la ARN polimerasa II aguas arriba del exón (Sakamoto *et al.*, 1999). También sugieren que las expansiones de GAA inducen cambios epigenéticos aberrantes que desempeñan un papel crucial en la inhibición de la transcripción de *FXN*, entre los que destacan la hipermetilación anormal del ADN (Castaldo *et al.*, 2008) y la hipoacetilación de las histonas (Chutake *et al.*, 2014). Estas modificaciones son responsables de la heterocromatización de la región que engloba al gen *FXN* y, por lo tanto, del silenciamiento génico.

### **1.1.1. Funciones de la frataxina**

La frataxina es un polipéptido de 210 aminoácidos que es codificado en el núcleo de las células. Posteriormente, se manifiesta en el citoplasma en forma de un polipéptido precursor y se transporta a la mitocondria, donde da lugar a la forma madura de 130 aminoácidos mediante la acción de la peptidasa de procesamiento mitocondrial (Schmucker *et al.*, 2008). La frataxina muestra una gran conservación a lo largo de la evolución, presentando homólogos ortólogos en una amplia gama de organismos, como mamíferos, bacterias, hongos y plantas (Tamarit *et al.*, 2016).

Se han postulado varias funciones relacionadas con la frataxina, de ahí el carácter multisistémico de la enfermedad. Entre ellas destacan su participación en la homeostasis del hierro y en el mantenimiento del equilibrio redox. No obstante, la única función que ha sido demostrada es que forma parte de un complejo que participa en la biosíntesis de centros de hierro-azufre (CFS) en la matriz mitocondrial. Este complejo está formado por la cisteína desulfurasa mitocondrial NFS1, la proteína *scaffold* ISCU, la proteína accesoria ISD11 y la proteína portadora de acilo ACP. Se conoce que

el complejo NFS1/ISCU es activada por la frataxina. Sin embargo, no se sabe exactamente si la frataxina actúa como donante de hierro o como regulador alostérico (Fox *et al.*, 2019).

Muchos de los síntomas observados en la AF son el resultado de alteraciones en la homeostasis del hierro intracelular y de la deficiencia en actividades de proteínas que requieren CFS. Estas proteínas incluyen complejos respiratorios mitocondriales, enzimas del ciclo de Krebs como la aconitasa y proteínas implicadas en la reparación del ADN y en la replicación (Zhang & Napierala, 2019). Además, los CFS son componentes inorgánicos esenciales que actúan como cofactores de proteínas llevando a cabo reacciones redox, desempeñando un papel fundamental en diversas funciones celulares claves. Estas funciones incluyen la fosforilación oxidativa, la catálisis enzimática y la regulación génica (Cook & Giunti, 2017). Así, un funcionamiento incorrecto de la cadena respiratoria provoca una desregulación del estrés oxidativo, que conlleva un incremento del número de especies reactivas de oxígeno (ROS) y una reducción de la producción de energía mitocondrial (Napoli *et al.*, 2006). También se ha estudiado en modelos de ratón YG8R que la deficiencia de frataxina es responsable de un desequilibrio de calcio, que provoca la formación de esferoides axonales en las neuronas (Mollá *et al.*, 2017).

### **1.1.2. Ferroptosis como causa de muerte celular en AF**

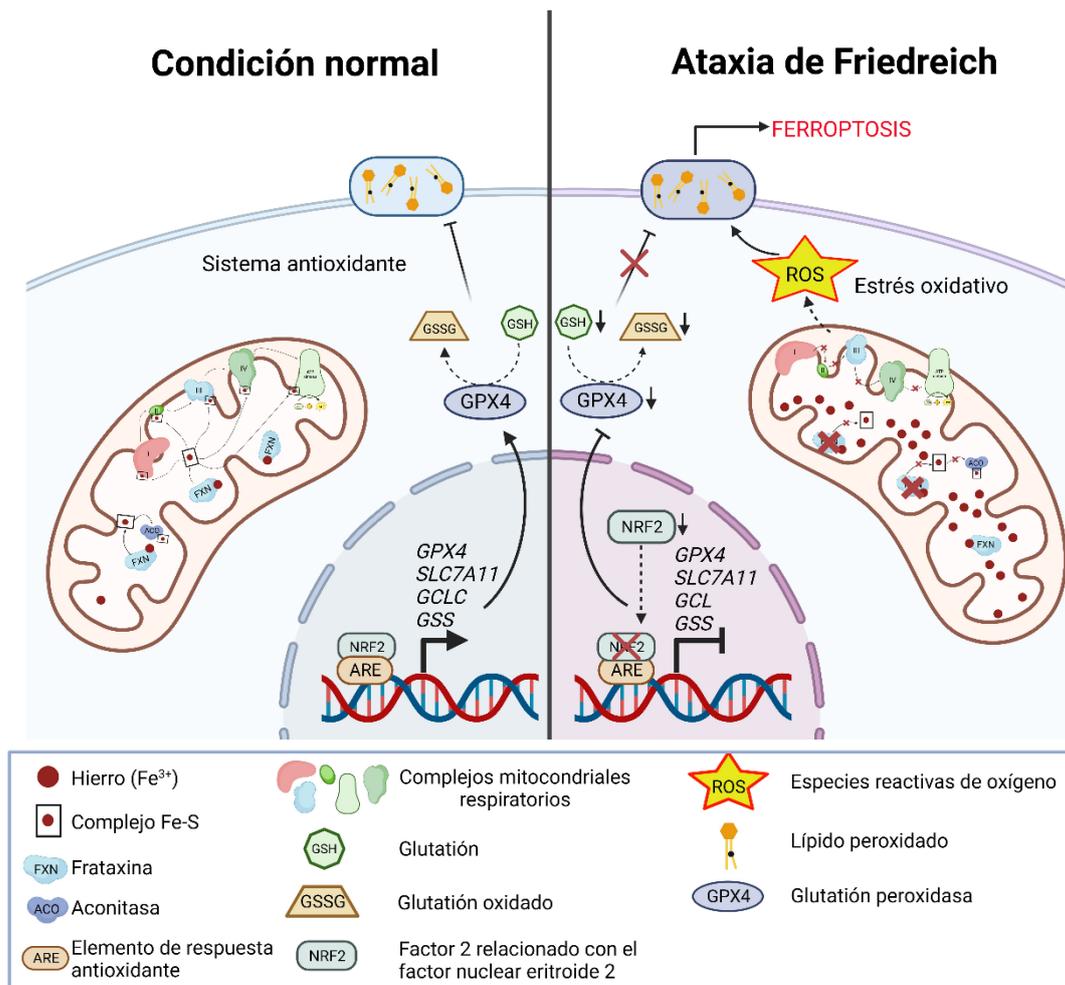
Uno de los aspectos más importantes de la enfermedad que aún sigue sin resolverse es la caracterización del tipo de muerte celular que afecta a las células y tejidos deficientes en frataxina. La mayoría de los estudios que abordan este aspecto se han realizado en diferentes células *in vitro*, entre las que destacan neuroblastomas (Palomo *et al.*, 2011), células de carcinoma P19 (Santos *et al.*, 2001), fibroblastos derivados de pacientes (Sanchez *et al.*, 2016) o iPSCs (Igoillo-Esteve *et al.*, 2014). Los hallazgos de estos estudios apuntan hacia la apoptosis como el modo de muerte celular desencadenado por la falta de frataxina, ya que se observó en los modelos celulares la activación de genes apoptóticos y la recuperación mediante fármacos antiapoptóticos. Sin embargo, al evaluar la cuestión de modelos de ratón *in vivo*, no se detectó ningún marcador de muerte celular por apoptosis (Simon *et al.*, 2004).

Una posibilidad muy atractiva es un nuevo tipo de muerte celular llamado ferroptosis. En 2012 se reconoció como un tipo de muerte celular programada inducida por hierro con características morfológicas, bioquímicas y genéticas diferentes a las formas de muerte celular más comunes, como la apoptosis, la necrosis y la autofagia (Dixon *et al.*, 2012). La desregulación del equilibrio redox intracelular, la peroxidación de los lípidos de membrana por la reacción de Fenton y la destrucción de la morfología mitocondrial son las principales características de la ferroptosis. Los principales inductores de la ferroptosis son aquellos que impiden la acción de las defensas antioxidantes endógenas, disminuyendo la cantidad de glutatión (GSH), la actividad de la enzima glutatión peroxidasa 4 (GPX4) o la expresión del factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (NRF2).

Este es un factor de transcripción que ante ciertos estímulos, como un incremento en la concentración de ROS, migra al núcleo y modula la expresión de muchos genes implicados en la modulación de la ferroptosis mediante su unión a la región promotora en cis, conocida como elemento de respuesta antioxidante (ARE) (Li *et al.*, 2020). Se ha comprobado que tanto *GPX4* como el sistema de transporte de cisteína/glutamato Xc- son genes que se encuentran regulados por NRF2 (Dodson *et al.*, 2019).

Por un lado, el gen *GPX4* es el responsable de la expresión de la enzima GPX4. Esta convierte el GSH en glutatión oxidado (GSSG) y reduce los peróxidos lipídicos citotóxicos a los correspondientes alcoholes (Li *et al.*, 2020). Por otro lado, el sistema de antiporte permite introducir cistina en el interior celular mediante la salida de glutamato, por medio de una proteína de membrana formada por dos subunidades: SLC7A11 y SLC3A2. La cistina se puede convertir en GSH mediante una serie de reacciones bioquímicas. Así, la cistina se reduce a cisteína por medio de la cisteína reductasa y luego la glutamato-cisteína ligasa (GCL) y la glutatión sintetasa (GSS) agregan L-glutamato y glicina, respectivamente, para producir GSH (Dodson *et al.*, 2019). De esta manera, ambos forman parte del sistema antioxidante del organismo que suministra compuestos reductores para eliminar sustancias oxidantes (Figura 1).

El papel aceptado de la frataxina en la biosíntesis de los CFS sitúa al hierro en el centro de la neurobiología y etiología de la enfermedad. De hecho, se ha observado un aumento del contenido de hierro en cardiomiocitos, ganglios de la raíz dorsal y el núcleo dentado de pacientes con AF (Koeppen, 2011), así como en modelos celulares (Costa *et al.*, 2023) y animales (Puccio *et al.*, 2001). Además, el alto contenido de hierro estimula la generación de ROS. En este sentido, se ha observado un aumento de los peróxidos lipídicos en muestras de plasma de pacientes con AF (Emond *et al.*, 2000) y en modelos de AF de ratón (Abeti *et al.*, 2016). Todo esto viene acompañado de una disminución significativa en los niveles de la molécula antioxidante GSH, demostrado en modelos de levadura y en linfoblastos de pacientes con AF (Bulteau *et al.*, 2012). Por lo tanto, la deficiencia de frataxina parece desencadenar algunas firmas moleculares que recapitulan las características distintivas de la muerte celular por ferroptosis (Figura 1). Además, muchos autores confirmaron una mayor sensibilidad hacia inductores de la ferroptosis como erastina, L-butionina-sulfoximina o alcohol (Xie *et al.*, 2016), y una recuperación cuando se trataron las células deficientes en frataxina con inhibidores de la ferroptosis, mientras que los inhibidores de apoptosis y necrosis no lograron proteger.



**Figura 1. Descripción general de las alteraciones observadas en la ataxia de Friedreich tras la deficiencia de expresión de frataxina y su asociación con la ferroptosis.** En la AF, la falta de frataxina conduce a una alteración del estado redox por varios mecanismos: (i) la incapacidad de generar clústeres de Fe-S ocasiona el desacoplamiento de la cadena de transporte de electrones en la mitocondria, provocando el aumento de ROS; (ii) la excesiva acumulación de hierro libre provoca un aumento de la producción de ROS a través de la química de Fenton; (iii) deterioro de la respuesta antioxidante debido a la inhibición del sistema de transporte cisteína/glutamato Xc- y de GPX4, ambos regulados por NRF2. Creado con BioRender.com.

## 1.2. Modelos de *Drosophila* para el estudio de la Ataxia de Friedreich

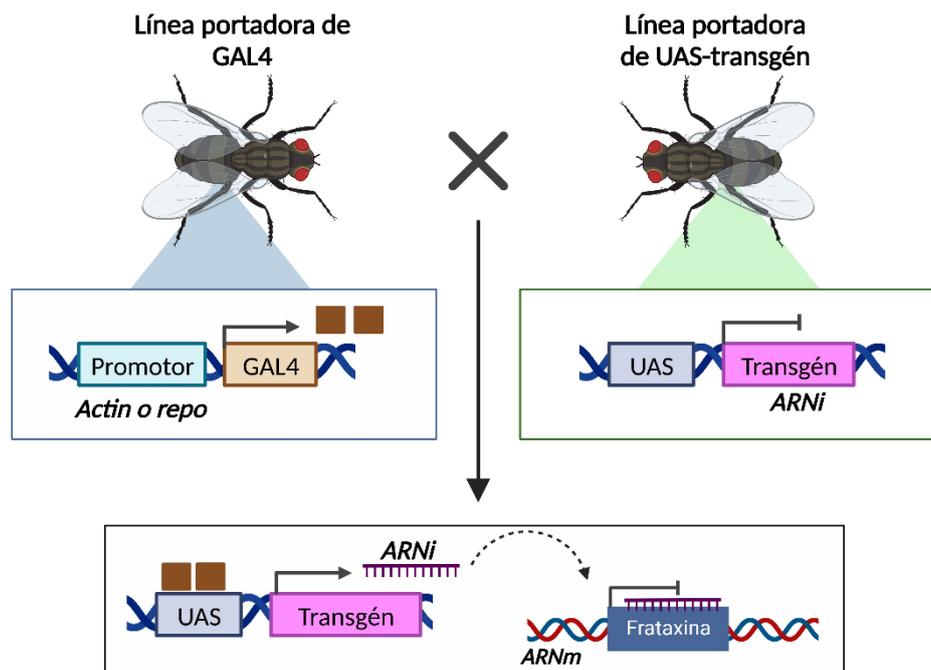
La identificación del gen asociado a la enfermedad y la comprensión del papel crucial de la frataxina en la cascada patológica han llevado a investigaciones innovadoras. Sin embargo, actualmente no existe una cura efectiva para la AF y únicamente hay un tratamiento recientemente aprobado por la FDA, la omaveloxolona (Lynch *et al.*, 2022). Se están llevando a cabo múltiples ensayos clínicos para evaluar diferentes compuestos farmacológicos en pacientes con la enfermedad de Friedreich. Estos ensayos se fundamentan en diversas estrategias, tales como incrementar la expresión de frataxina, disminuir el estrés oxidativo, mejorar la función mitocondrial, reducir la toxicidad causada por el hierro o modular las vías metabólicas reguladas por la frataxina (Aranca *et al.*, 2016). El

descubrimiento de fármacos es un desafío que requiere de biomarcadores adecuados de la enfermedad y modelos animales o celulares apropiados para su estudio. Por ello, se ha recurrido a organismos complejos como *Drosophila*, debido a su versatilidad y fácil manejo, así como a su corto tiempo de generación. Además, gracias al alto grado de conservación del gen de la frataxina es posible estudiar su función en otros organismos modelo.

*Drosophila melanogaster* posee un gen homólogo a la frataxina humana, el gen *fh*. Este gen se encuentra en la región 8C/D del cromosoma X de las moscas y estructuralmente está compuesto de dos exones separados por un intrón. Tras la transcripción y traducción, da lugar a una proteína de 190 aminoácidos (Cañizares *et al.*, 2000). Para poder estudiar los mecanismos fisiopatológicos de la AF es necesario reproducir las características moleculares y bioquímicas del trastorno humano en la mosca, es decir, disminuir la expresión de frataxina. Gracias a las herramientas genéticas y métodos de edición genómica que se han desarrollado e implementado en la mosca de la fruta, *Drosophila* ofrece una plataforma inigualable para su estudio.

Se han desarrollado una serie de modelos de AF en *D. melanogaster* a partir del silenciamiento postranscripcional del gen *fh* a través de la metodología de interferencia de ARN (ARNi), basada en el sistema GAL4/UAS (Monnier *et al.*, 2018). Por un lado, una línea de *Drosophila* expresa GAL4 con el promotor de tejido específico, como puede ser actin (expresión de GAL4 en todos los tejidos de la mosca) o repo (expresión de GAL4 en las células de glía). Por otro lado, otra línea expresa el transgén, como por ejemplo el ARNi, bajo el control de UAS, una secuencia de activación aguas arriba del gen (Brand & Perrimon, 1993). De esta manera, en la progenie de este cruce, se activa la secuencia UAS-ARNi en aquellas células donde se expresa GAL4, provocando el silenciamiento del gen de la frataxina (Figura 2), imitando los fenotipos de los pacientes con AF (Llorens *et al.*, 2007).

La pérdida de la función del gen *fh* en la mosca de la fruta reproduce importantes características bioquímicas, celulares y fisiológicas de la AF. La reducción de la síntesis de frataxina conlleva un menor tiempo de vida de las moscas, locomoción reducida, degeneración neuronal, estrés oxidativo, atrofia cardíaca y desregulación del metabolismo del hierro (Calap-Quintana *et al.*, 2018). Se ha demostrado que la deficiencia de frataxina en *Drosophila* afecta a la función de las proteínas mitocondriales que necesitan el cofactor de Fe-S para llevar a cabo su función, como la aconitasa y los complejos respiratorios mitocondriales (Llorens *et al.*, 2007). Además, este organismo ha revelado fenotipos previamente no descritos, lo que ha permitido identificar nuevos elementos clave en la patogénesis de la AF, como la participación de la frataxina en la homeostasis de los lípidos (Navarro *et al.*, 2010) y en la homeostasis del  $Ca^{2+}$ , siendo importante en la comunicación entre el retículo endoplásmico y las mitocondrias (Rodríguez *et al.*, 2020a).



**Figura 2.** El sistema GAL4/UAS es utilizado en *Drosophila melanogaster* para suprimir la expresión de frataxina, generando un modelo animal *in vivo* de AF para estudiar la enfermedad. Se necesitan dos líneas transgénicas: (i) línea de *Drosophila* que contiene el factor de transcripción GAL4 aguas abajo de un promotor de expresión específico de tejido (actin: expresión ubicua en toda la mosca o repo: expresión en las células gliales); (ii) línea transgénica que contiene el gen de interés (ARNi) colocado aguas abajo del elemento UAS. En la descendencia, en las células en las que se expresa GAL4, se transcribe el ARNi, que silencia específicamente al gen de la frataxina. Imagen adaptada de Calap-Quintana *et al.* (2018). Creado con BioRender.com.

### 1.3. Inhibidores de ferroptosis como tratamiento de la AF

Los marcadores ferroptóticos y sus potenciales tratamientos han sido descritos en modelos celulares de AF *in vitro*. La bibliografía muestra como este tipo de muerte celular en la AF se restaura farmacológicamente utilizando inhibidores ferroptóticos (ferrostatina-1 y glutatión) en células de fibrosarcoma humano HT-1800 (Du *et al.*, 2020). Otros emplean derivados del ácido oleico o fenotiazinas lipofílicas que han demostrado su eficacia en la disminución de la ferroptosis en modelos celulares (Lynch & Farmer, 2021). No obstante, debido al carácter emergente de la ferroptosis en el campo de la investigación, el número de modelos *in vivo* robustos y apropiados es mínimo. Por lo tanto, con el fin de evitar las mismas discrepancias observadas en la traducción de los resultados sobre la apoptosis desde cultivos celulares a modelos superiores, es de suma importancia probar el impacto de la ferroptosis en modelos *in vivo* pluricelulares como *Drosophila*. Esto permitirá llegar a una mayor comprensión del mecanismo subyacente a la neurodegeneración, así como identificar nuevas dianas terapéuticas. Además, estos organismos son excelentes modelos para testar diferentes tratamientos farmacológicos previo a un ensayo clínico.

## 2. OBJETIVO

El objetivo general de este estudio es determinar si la inhibición genética y farmacológica de la ferroptosis son capaces de rescatar los fenotipos asociados a la AF *in vivo* en moscas modelo de *Drosophila* para la enfermedad. De esta manera, si la inhibición es protectora se podría sugerir que la ferroptosis es la principal causa de muerte celular en la AF.

Para ello, el trabajo aborda tres objetivos específicos:

1. Analizar la expresión de genes proapoptóticos en moscas con deficiencia de frataxina en todo el cuerpo.
2. Estudiar el efecto de la coexpresión de la glutatión peroxidasa 1 de ratón en los modelos de AF en la mosca de la fruta.
3. Estudiar el efecto del tratamiento farmacológico con N-acetilcisteína a diferentes concentraciones y N-acetilcisteína amida en los modelos de AF en *Drosophila*.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Mantenimiento y stocks de *Drosophila*

Las cepas y los cruces de *Drosophila* fueron mantenidos a una temperatura de 25°C en un medio fresco de harina de maíz y agar estándar (1L agua; 10,5g agar; 60g levadura; 10g harina de soja; 60g harina de maíz; 50g de azúcar; 5mL ácido propiónico; 10mL de etanol; 3g nipagín) en ciclos de 12 horas de luz y oscuridad. Los cruces se llevaron a cabo cruzando 4 hembras vírgenes con 6 machos. Tras la eclosión de las pupas a los 10 días, los machos con el genotipo de interés fueron transferidos a viales de comida fresca (con o sin fármaco), llevando a cabo el cambio de comida cada 2 o 3 días. Los genotipos de las moscas empleadas y los cruces realizados para realizar los experimentos se muestran en la tabla 1 y la tabla 2, respectivamente.

**Tabla 1. Stocks de *Drosophila*.**

Genotipo	Descripción de la cepa	Fuente
<i>Actin-GAL4/TM6B</i>	Expresión de GAL4 ubicua	Stock 3954 del B.S.C*
<i>Repo-GAL4/TM6B</i>	Expresión de GAL4 en la glía	Stock 7415 del B.S.C
<i>fhRNAi2/CyO; Actin-GAL4/TM6B</i>	Silenciamiento moderado de frataxina en toda la mosca	Laboratorio G. M. H <sup>#</sup>
<i>fhRNAi1/CyO; Repo-GAL4/TM6B</i>	Silenciamiento fuerte de frataxina en la glía	Laboratorio G. M. H
UAS- <i>mGPX1/CyO</i> (4616-2-4M)	Coexpresión de la glutatión peroxidasa 1 de ratón	Cedida por Prof. Flaviano Giorgino
<i>w<sup>1118</sup></i>	Alelo mutante del gen <i>white</i>	Laboratorio G. M. H

\*Bloomington Stock Center; <sup>#</sup>Laboratorio Genético Molecular Humana, Facultad de ciencias biológicas (Universitat de València); RNAi: ARN de interferencia

**Tabla 2. Cruces de *Drosophila melanogaster* realizados y nomenclatura de la descendencia empleada.**

Cruce	Genotipo de la descendencia	Nomenclatura de la descendencia en los resultados
♀ <i>Actin-GAL4/TM6B</i> x ♂ <i>w<sup>1118</sup></i>	<i>Actin-GAL4/+</i>	<i>ActinG4&gt;w</i>
♀ <i>Repo-GAL4/TM6B</i> x ♂ <i>w<sup>1118</sup></i>	<i>Repo-GAL4/+</i>	<i>RepoG4&gt;w</i>
♀ <i>fhRNAi2/CyO; Actin-GAL4/TM6B</i> x ♂ <i>w<sup>1118</sup></i>	<i>fhRNAi2/+; Actin-GAL4/+</i>	<i>ActinG4&gt;fhRNAi2</i>

♀ <i>fhRNAi1/CyO; Repo-GAL4/TM6B</i> x ♂ <i>w<sup>1118</sup></i>	<i>fhRNAi1/+; Repo-GAL4/+</i>	<i>RepoG4&gt;fhRNAi1</i>
♀ <i>Actin-GAL4/TM6B</i> x ♂ <i>UAS-mGPX1/CyO</i>	<i>UAS-mGPX1/+; Actin-GAL4/+</i>	<i>ActinG4&gt;mGPX1</i>
♀ <i>Repo-GAL4/TM6B</i> x ♂ <i>UAS-mGPX1/CyO</i>	<i>UAS-mGPX1/+; Repo-GAL4/+</i>	<i>RepoG4&gt;mGPX1</i>
♀ <i>fhRNAi2/CyO; Actin-GAL4/TM6B</i> x ♂ <i>UAS-mGPX1/CyO</i>	<i>fhRNAi2/UAS-mGPX1;</i> <i>Actin-GAL4/+</i>	<i>ActinG4&gt;fhRNAi2, mGPX1</i>
♀ <i>fhRNAi1/CyO; Repo-GAL4/TM6B</i> x ♂ <i>UAS-mGPX1/CyO</i>	<i>fhRNAi1/ UAS-mGPX1;</i> <i>Repo-GAL4/+</i>	<i>RepoG4&gt;fhRNAi1, mGPX1</i>

♀: hembras; ♂: machos; RNAi: ARN de interferencia

### 3.2. Tratamientos farmacológicos

Los fármacos empleados para llevar a cabo los experimentos fueron N-acetilcisteína (NAC) y N-acetilcisteína amida (NACa). Por un lado, el stock de NAC se preparó a partir de la dilución de 250 mg de NAC en polvo en 5 mL de H<sub>2</sub>O, obteniendo una concentración de 300 mM. Se evaluaron dos concentraciones diferentes: 1 y 2,5 mM. Para ello, se diluyó el stock a razón de 1:5 para obtener una concentración de 60 mM y a razón de 1:2 para llegar a la concentración de 150 mM. Así, en ambos casos, se homogeneizó 100 µL de fármaco diluido con 6 mL de comida líquida, obteniendo una concentración final de 1 y 2,5 mM respectivamente. Por otro lado, el stock de NACa se llevó a cabo a partir de la dilución de 25 mg de químico en 1250 µL de H<sub>2</sub>O, obteniendo una concentración de 20 mg/mL. Para alcanzar la concentración de trabajo, 40 µg/mL, se diluyó el stock a razón de 1:10 en H<sub>2</sub>O (2mg/mL) y posteriormente se mezclaron 2mL de comida de mosca por cada 40 µL de fármaco diluido. El tratamiento con NAC se realizó desde el desarrollo en todos los genotipos, mientras que el tratamiento con NACa se llevó a cabo desde el desarrollo en moscas con deficiencia de frataxina de forma ubicua y en la etapa adulta en moscas con deficiencia de frataxina en la glía.

### 3.3. Análisis de la expresión génica

#### 3.3.1. Extracción de ARN

La extracción de ARN se realizó mediante la combinación del protocolo de extracción en columna *MaXtract High Density* (Qiagen) y *miRNeasy Mini* (Qiagen). El ARN total se extrajo de 15 moscas enteras que se combinaron con 500 µL de *QIAzol Lysis Reagent* y se homogeneizaron por agitación en el dispositivo *TissueLyser LT* (Qiagen). Siguiendo las instrucciones del fabricante, el homogeneizado se centrifugó a 12400 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos a 4°C para eliminar los restos insolubles, se recogió el sobrenadante y se añadió a un tubo *MaXtract*.

Seguidamente, se añadió 100 µL de cloroformo, se mezcló suavemente y se dejó reposar 3 minutos a temperatura ambiente (TA). Para separar la fase orgánica de la acuosa, se volvió a centrifugar la muestra a 12400 rpm durante 5 minutos a 4°C, recuperando la fase acuosa en un nuevo tubo. Se añadió 1,5 veces el volumen obtenido anteriormente de etanol 100 %, formando un precipitado de ácidos nucleicos. El siguiente paso consistió en pipetear 700 µL de muestra (incluyendo el precipitado) en una *RNeasy Mini spin column* dentro de un *ependorf* de 2mL de recolecta y se centrifugó a 12000 rpm durante 15 segundos a TA. En la columna se retiene el ARN y el sobrenadante se descarta. Así, se llevaron a cabo tres pasos de lavado de la columna con volúmenes de 700, 500 y 500 µL de *Buffer RPE* y centrifugaciones de 12000 rpm durante 15 s a TA. Finalmente, se volvió a centrifugar la columna sin añadir volumen para eliminar los restos de *buffer* y se añadió 50 µL de agua *RNase-free*. De esta manera, tras centrifugar en las mismas condiciones se obtuvo la elución de ARN. La concentración y la pureza del ARN se cuantificó con el dispositivo *Nanodrop 2000* midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm.

### 3.3.2. Síntesis de ADNc

Se emplearon 500 ng de ARN para su conversión a ADNc a través del *QuantiTect Reverse Transcription kit* (Qiagen). En primer lugar, se eliminó el ADN genómico de la muestra extraída a través de la adición de 1 µL de *gDNA-wipe out buffer (7x)* y el volumen de *RNase-free water* hasta completar un volumen de 7 µL, todo preparado en hielo. Seguidamente, se incubó durante 2 minutos a 42°C. Una vez finalizado este proceso, se llevó a cabo la retrotranscripción del *gDNA-wipe out*. Para ello, se preparó la *master mix* presente en la tabla 3 y se incubó a 42°C durante 40 minutos. Para inactivar la transcriptasa, se incubó la preparación 3 minutos a 95°C. Finalmente, el ADNc generado se diluyó 1:10 en agua libre de nucleasas y se almacenó a -80°C para posteriores experimentos.

**Tabla 3. Volúmenes y reactivos necesarios para la retrotranscripción del ARN a ADNc.**

Reactivo	Volumen
<i>Quantiscript RT buffer (5x)</i>	2 µL
<i>Quantiscript reverse transcriptase</i>	0,5 µL
<i>Oligo(dt) primer</i>	0,5 µL
<i>gDNA-wipe out</i>	Hasta un volumen final de 10 µL

### 3.3.3. PCR semicuantitativa a tiempo real

La técnica de la PCR semicuantitativa a tiempo real (RT-qPCR) se utilizó para determinar el nivel relativo de la expresión de genes típicos en apoptosis (*hid*, *reaper* y *Diap1*) en comparación a la expresión del gen de referencia interno de *Drosophila*, el gen ribosómico *RP49*. Las secuencias de los cebadores se encuentran en la tabla 1 del anexo. Las reacciones de qPCR se prepararon en placas

*MicroAmp Fast 96-Well Reaction Plate (0,1mL)* (Applied Biosystems), depositando en cada pocillo 10  $\mu\text{L}$  de la mezcla detallada en la tabla 4. La reacción en cadena de la polimerasa se llevó a cabo en el dispositivo *StepOne Plus* (Applied Biosystems) y la expresión relativa de los genes diana y del control interno se cuantificaron durante la fase exponencial de la reacción de PCR mediante el método  $\Delta\Delta\text{Ct}$  (Livak & Schmittgen, 2001). Cada muestra se realizó por triplicado y los resultados se obtuvieron a partir de 5 réplicas biológicas independientes.

**Tabla 4. Composición de la reacción RT-qPCR.**

Reactivo	Volumen
ADNc	0,5 $\mu\text{L}$
<i>SYBR Green</i>	5 $\mu\text{L}$
<i>Primer forward</i> (1:10)	0,4 $\mu\text{L}$
<i>Primer reverse</i> (1:10)	0,4 $\mu\text{L}$
<i>Rox dye</i>	0,2 $\mu\text{L}$
H <sub>2</sub> O	3,5 $\mu\text{L}$

### 3.4. Cuantificación de los niveles de ATP

#### 3.4.1. Preparación de la muestra

Se seleccionaron 5 moscas por genotipo y condición, con un total de 5 réplicas biológicas independientes. Las moscas se homogeneizaron en tampón de extracción de ATP (100mM Tris, 4mM EDTA, pH 7.75) previamente calentado a 95°C. Tras la homogeneización con el *biovortex*, las muestras se calentaron de nuevo a 95°C durante 2 min y se centrifugaron durante 1 min a 3500 rpm a 4°C. Finalmente, el sobrenadante se recogió en nuevos tubos.

#### 3.4.2. Ensayo de la luciferasa

Los niveles de ATP fueron medidos con el *ATP Bioluminescence Assay Kit HS II* en placas de 96 pocillos de fondo oscuro (*Greiner Flat Bottom Black Polystyrol*). Para ello, se diluyó 40  $\mu\text{L}$  de sobrenadante en 80  $\mu\text{L}$  de *ATP buffer* (dilución 1:3). Posteriormente, se añadieron en cada pocillo 50  $\mu\text{L}$  de luciferasa y 50  $\mu\text{L}$  de muestra diluida y se midió la luminiscencia en el dispositivo *TECAN Spark Infinity plate reader*. Los parámetros de medida fueron los siguientes: tiempo de integración: 10000 ms, tiempo de asentamiento: 1000 ms y atenuación automática. La concentración de ATP en M se calculó interpolando el valor de la luminiscencia de cada muestra en una recta patrón realizada con concentraciones de ATP conocidas. No obstante, para conocer la concentración real de ATP fue necesario normalizar dichos valores con el contenido proteico de las muestras. Cada una de las muestras se leyó por duplicado.

### 3.4.3. Ensayo Bradford

Mediante el ensayo *Bradford* se determinó la concentración de proteínas en la muestra sin diluir a través del *Coomassie Plus Protein Assay*. En el ensayo, 1 mL del reactivo *Bradford*, previamente atemperado a TA, se mezcló con 20  $\mu$ L de muestra y se dejó incubar durante 5 minutos a TA. Posteriormente, 300  $\mu$ L de la mezcla fueron pipeteados por duplicado en una placa de 96 pocillos transparente y se midió la absorbancia a 595 nm en el *TECAN Spark Infinity plate reader*. Tras la eliminación del valor de absorbancia del blanco (reactivo *Bradford* + *ATP buffer*) para cada una de las muestras, la concentración de proteínas en mg/mL se calculó interpolando el valor de la absorbancia en una recta patrón de seroalbúmina bovina de concentración conocida.

### 3.5. Inmunohistoquímica

Las moscas, a los 30 días de vida, fueron fijadas durante 2 horas en PFA 4 % - Triton X-100 (0,5 %) a TA y en constante agitación. Seguidamente, se realizaron 3 lavados de 30 minutos con PBS (1X) y se diseccionaron los cerebros. Una vez extraídos, se llevaron a cabo 5 lavados con PBS-T (0,5 %) de 15 minutos y se dejaron incubar con un colorante para la tinción de lípidos neutros denominado BODIPY 495 a 4°C en oscuridad durante toda la noche a una dilución 1:500. Al día siguiente, el anticuerpo que no ha interactuado con la superficie del cerebro es eliminado por medio de 3 lavados de 15 minutos con PBS-T (0,5 %). Finalmente, los cerebros fueron colocados en un portaobjetos en el medio de montaje *Vectashield* y visualizados en el microscopio confocal LSM 800 (Zeiss). Las disecciones se realizaron con 15 moscas aproximadamente por genotipo y condición.

### 3.6. Secciones de cerebros en parafina

Las moscas de 30 días de edad fueron colocadas en unos collares metálicos con una ranura que permite separar la cabeza del cuerpo y fueron fijadas en la solución de *Carnoy* (etanol:cloroformo:ácido acético en una proporción de 6:3:1) durante 3 h 30 min. Seguidamente, para deshidratar el tejido se realizaron tres lavados de 30 min con etanol 99 % y finalmente los collares se dejaron en una solución de metilbenzoato toda la noche a TA. Al día siguiente, los collares se movieron a una solución 1:1 de metilbenzoato y parafina a 60°C durante 1 hora. Posteriormente, se realizaron 6 lavados de 30 min en parafina a 60°C y se construyeron bloques de parafina colocando el collar en moldes y depositando parafina líquida en su interior hasta que solidifique a TA. Estos bloques fueron cortados en un microtomo, generando cortes de 7  $\mu$ m, y depositados en portaobjetos cubiertos con una solución acuosa de BSA-glicerina. A continuación, se desparafinaron los cortes mediante dos lavados de 30 min en xilol a 60°C. Por último, se montó la preparación con cubreobjetos y el medio de montaje DePeX y se observó en un microscopio de fluorescencia LEICA DMI3000 B (longitud de onda de 470nm) aprovechando la autofluorescencia propia de los ojos de *Drosophila*, que al cortar con la cuchilla se extiende por todo el cerebro.

### 3.7. Ensayo de longevidad

El ensayo consistió en medir la supervivencia de las moscas. Para ello, se recogieron 75 machos por genotipo y condición y se dividieron en tres viales con comida normal o con comida mezclada con el fármaco de estudio (NAC 1mM y NACa). Se anotó el número de muertes por genotipo y fármaco cada 2 días hasta la muerte de todos los individuos.

### 3.8. Ensayo de geotaxis negativa

Se evaluó la capacidad de las moscas de escalar por unas pipetas de plástico de 24 cm de altura y 2 cm de diámetro como medida de su capacidad locomotora. Se examinaron entre 10 y 15 moscas por genotipo y condición a los 15 días de vida, registrando cada una de ellas en tres ocasiones. Se introdujeron en las pipetas de plástico, y tras 2 minutos de adaptación, se midió la altura máxima que las moscas eran capaces de trepar en 12 s. Se utilizó el promedio de cada mosca para calcular la velocidad media de escalada en cm/s.

### 3.9. Análisis estadísticos

En los experimentos, los análisis estadísticos fueron realizados usando el programa *Graphpad Prism* versión 7.04, La Joya, CA. USA. Las gráficas se han representado con los valores de la media y el error estándar de la media. En los experimentos de biología molecular los datos están relacionados con 3-5 réplicas biológicas independientes, mientras que en los experimentos de locomoción se llevaron a cabo alrededor de 12 réplicas. Los test estadísticos utilizados fueron t-student de dos colas, ANOVA de una vía y el test de Mantel-Cox para el análisis de las curvas de supervivencia. La significancia estadística se representa de la siguiente forma: \*\*\*\*:  $P < 0,0001$ ; \*\*\*:  $P < 0,001$ ; \*\*:  $P < 0,01$ ; \*:  $P < 0,05$ . Todas las gráficas están representadas como la media  $\pm$  SEM.

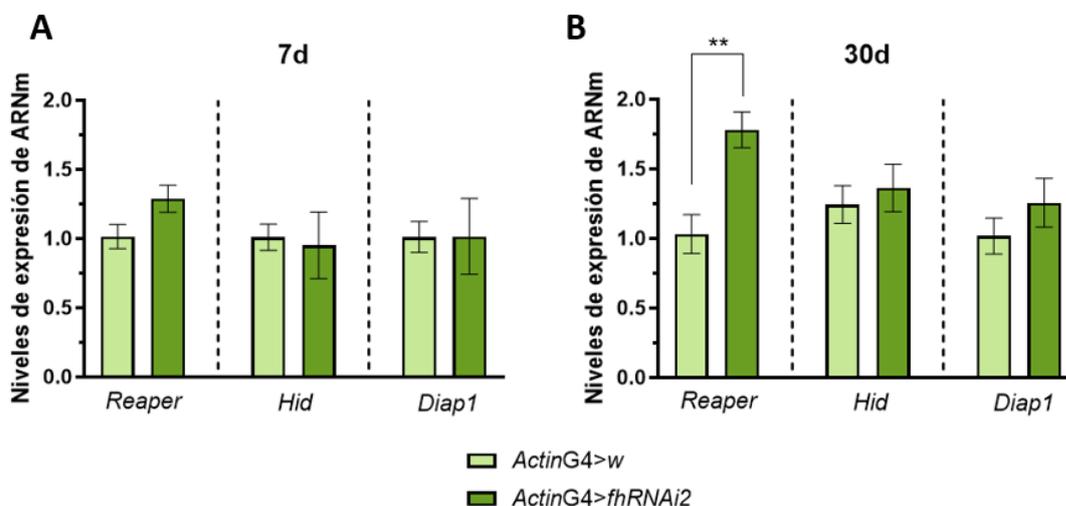
## 4. RESULTADOS

### 4.1. La apoptosis no es la principal ruta de muerte celular en modelos de AF en *D. melanogaster*

#### *melanogaster*

Los estudios en modelos celulares *in vitro* apuntan a que la apoptosis es el mecanismo de muerte celular desencadenado por la falta de frataxina (Sanchez *et al.*, 2016; Palomo *et al.*, 2011). No obstante, un estudio en modelos de ratón no corroboró esta hipótesis al no detectar ningún marcador propio de esta (Simon *et al.*, 2004). Así, en este experimento se estudió la expresión de diferentes marcadores apoptóticos en otro modelo animal como *Drosophila* para confirmar que la muerte celular no se produce mediante apoptosis, sino por otras rutas tales como, por ejemplo, la ferroptosis. Estos marcadores fueron *Diap1*, esencial para prevenir la activación inapropiada de caspasas y la apoptosis ubicua, *reaper* y *hid*, los cuales son antagonistas naturales de *Diap1*, por lo que su expresión conduce a una potente inducción de la apoptosis (Steller, 2008).

En las moscas de 7 días de edad no se observó diferencias significativas en la expresión de los genes apoptóticos entre las moscas control y las moscas deficientes de frataxina de forma ubicua (Figura 3A). No obstante, sí que se observó un incremento estadísticamente significativo del 72,6 % en la expresión del gen *reaper* en moscas de 30 días de edad con AF respecto al control (Figura 3B). Nuestros resultados sugieren que es posible que la apoptosis se produzca cuando la enfermedad está totalmente desarrollada, pero no de forma única, pues solo se sobreexpresa uno de los genes proapoptóticos.



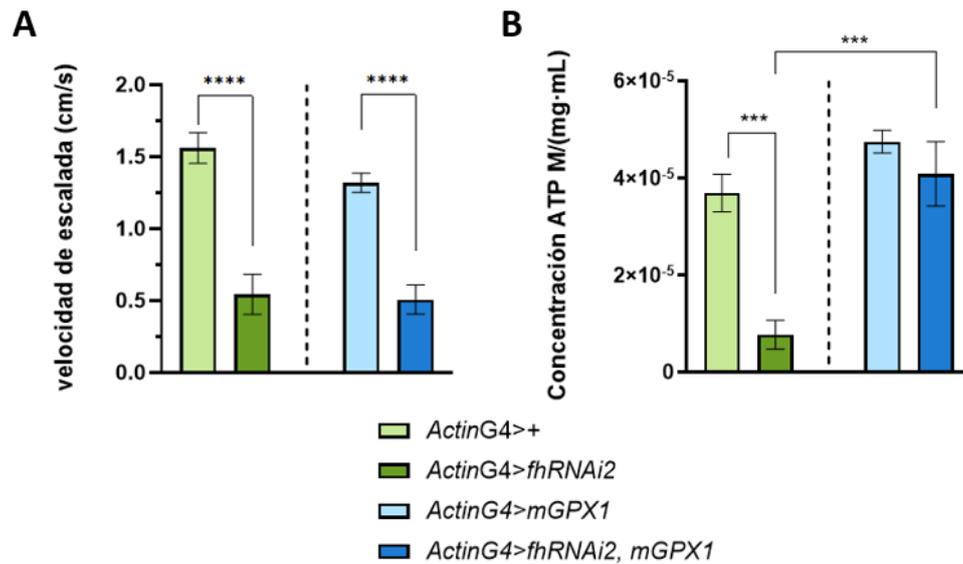
**Figura 3. Análisis de la expresión relativa de genes apoptóticos.** (A) Expresión relativa de los genes *reaper*, *hid* y *Diap1* a los 7 días de vida en moscas control y deficientes de frataxina. (B) Expresión relativa de los genes *reaper*, *hid* y *Diap1* a los 30 días de vida en moscas control y deficientes de frataxina. Únicamente se observa un incremento del 72,6 % en la expresión de *reaper*. La significancia estadística fue calculada mediante T-test independientes. \*\*P<0,01.

## 4.2. La inhibición genética de la ferroptosis rescata la fisiología en modelos de AF en *D. melanogaster*

Las glutatión peroxidasas (GPx) son conocidas por catalizar la reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o hidroperóxidos orgánicos a agua o a los alcoholes correspondientes, respectivamente, utilizando como agente reductor GSH (Ursini *et al.*, 1995). Se decidió coexpresar la glutatión peroxidasa 1 de ratón (*mGPX1*) en *Drosophila* debido a su efecto neuroprotector en otros trabajos de *Drosophila* (Mason *et al.*, 2013). De esta manera se evaluó si la actividad conjunta de GTPX1 propia de la mosca de la fruta, con actividad tiorredoxina peroxidasa (Missirlis *et al.*, 2003), junto con la *mGPX1* eran capaces de mantener el estado redox en los modelos deficientes de frataxina y, por lo tanto, inhibir las principales características de la muerte celular por ferroptosis. Los experimentos se llevaron a cabo en modelos de *Drosophila melanogaster* que mediante el sistema GAL4/UAS generaron moscas deficientes de frataxina de forma ubicua o únicamente en las células gliales, imitando la cascada patológica de los pacientes con AF (Monnier *et al.*, 2018). La comprobación de la expresión de la construcción *mGPX1* se representa en la figura 1 del anexo.

El primer paso fue estudiar el efecto de la interacción genética sobre los fenotipos asociados a la falta de frataxina de forma ubicua, tal y como ocurre en los pacientes. Con este objetivo, se llevaron a cabo ensayos de locomoción y de actividad energética mitocondrial. Por un lado, en moscas deficientes de 12-14 días de edad se observó que la velocidad de escalada disminuye un 65 % respecto al control (Figura 4A). Sorprendentemente, el mismo resultado se observó en aquellas moscas que coexpresan *mGPX1* de forma ubicua, siendo la capacidad de escalada un 82 % menor respecto al control (Figura 4A). Por lo tanto, la introducción artificial de una GPx que forma parte de la ruta antioxidante endógena en todos los tejidos no tiene ningún efecto en la capacidad locomotora de las moscas.

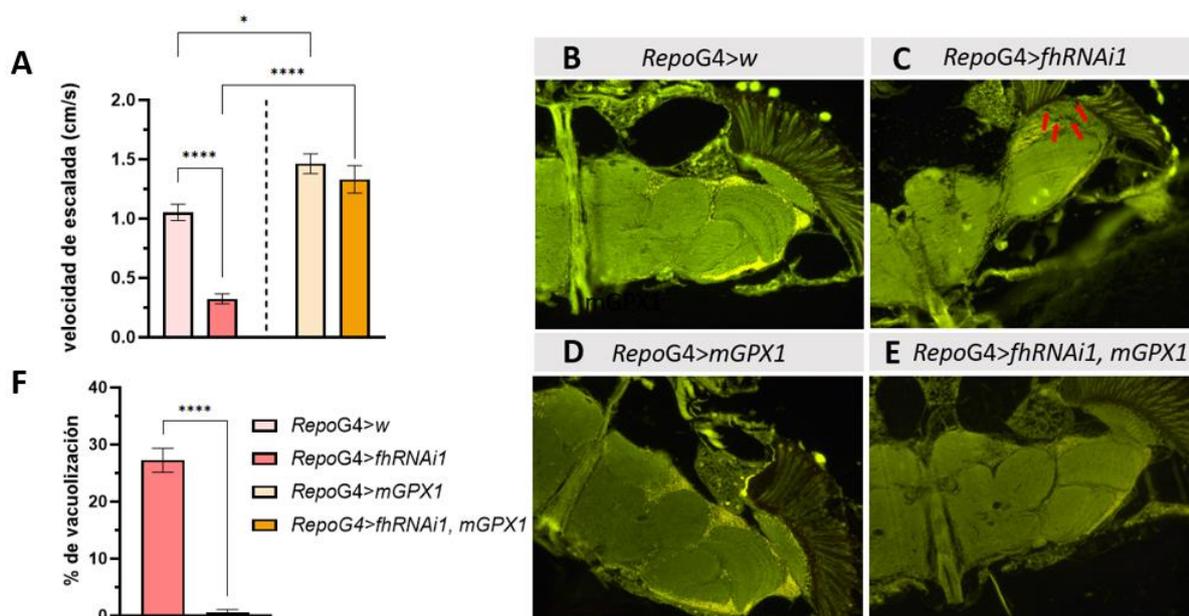
Otra de las manifestaciones patológicas que se evaluaron de la AF es la producción reducida de ATP mitocondrial. La deficiencia de frataxina produce una insuficiencia secundaria de proteínas que contienen grupos de Fe-S, como es el caso del sistema de fosforilación oxidativa mitocondrial, lo que explica la disminución (Napoli *et al.*, 2006). Para comprobar si la coexpresión de *mGPX1* y, por lo tanto, una mayor producción de GSH mejoraba la función mitocondrial, se cuantificó la cantidad de ATP por mg de proteína en moscas modelos de AF de 15 días de edad. Tal y como se esperaba, la concentración de ATP en moscas control y moscas deficientes de frataxina en todo el cuerpo fue significativamente diferente, siendo un 79,2 % menor (Figura 4B). En el caso de la coexpresión de *mGPX1* los resultados muestran como disparó la producción de ATP en la mitocondria en modelos de AF, mostrando un aumento del 81,2 % en la concentración. Estos resultados sugieren la importante función de las GPx en el mantenimiento de la homeostasis en la mitocondria, evitando la producción de ROS.



**Figura 4. Efecto de la coexpresión de *mGPX1* en moscas modelo de AF con deficiencia ubicua de frataxina. (A)** Geotaxis negativa en moscas de 12-14 días de edad. **(B)** Concentración de ATP en moscas de 15 días de edad. Se observa una deficiencia del 65 % en la capacidad locomotora de las moscas modelo de AF con la frataxina interferida en todo el cuerpo. Los modelos que coexpresan *mGPX1* no mejoran la capacidad de escalada (A). También se observa que existe una disminución clara en los niveles de ATP entre moscas control y moscas con falta de frataxina (B). Además, aquellas que han sido coexpresadas con la *mGPX1* aumentan significativamente la concentración de ATP (81,2 %) y, por lo tanto, la función mitocondrial. Ambos análisis se calcularon mediante ANOVA de una vía con análisis *post hoc* mediante el test de comparaciones múltiples de Tukey. \*\*\*\* $P < 0,0001$ ; \*\*\* $P < 0,001$

Posteriormente, se estudió el impacto de la inhibición genética de la ferroptosis en la función glial de la frataxina. Para ello, examinamos los principales defectos fisiológicos de la AF en moscas con expresión deficiente de frataxina en la zona panglial (Navarro *et al.*, 2010). El primer experimento consistió en estudiar la capacidad locomotora a través de un ensayo de geotaxis negativa en moscas de 12-14 días de edad. Como era de esperar, la capacidad de escalada disminuyó considerablemente en comparación con las moscas control, un 69,2 %. No obstante, aquellos individuos modelo que expresan *mGPX1* en las células gliales presentaron una mejora en la locomoción estadísticamente significativa del 310,67 % respecto a las no coexpresadas, con una velocidad de escalada cercana a los controles (Figura 5A). Además, se observó que la expresión de *mGPX1* en moscas control, cuya expresión de frataxina no ha sido alterada, provocó un incremento del 39 % de la velocidad de escalada. Este resultado habla de la importancia de las GPx en las células gliales y su implicación en las enfermedades neurodegenerativas.

También se evaluó si la modificación genética mejoraba la integridad de los cerebros en modelos de AF de *Drosophila*. La bibliografía muestra como los cerebros de *Drosophila* que presentan una falta de frataxina muestran defectos degenerativos en forma vacuolización, principalmente en la zona del quiasma (Navarro *et al.*, 2010). Así, se sugirió que la coexpresión de *mGPX1* podría evitar la aparición de vacuolas. Se llevaron a cabo cortes de cerebro de parafina de moscas control y de moscas con el gen de la frataxina silenciado en la glía, ambas con 35 días de edad. Los resultados muestran como la neurodegeneración en las moscas *RepoG4>fhRNAi1* (Figura 5C) fue visiblemente mayor que en las moscas control (Figura 5B), con una estructura más deteriorada y presencia de vacuolización en la zona del quiasma. Sin embargo, en las moscas *RepoG4>fhRNAi1, mGPX1* (Figura 5E) no se observó aparentemente ninguna vacuola, al igual que en el control (Figura 5D), siendo la disminución del 98 % (Figura 5F). Por lo tanto, se refuerza la idea de que la coexpresión de *mGPX1* es capaz de recuperar la neurodegeneración de los modelos de AF en *Drosophila*.



**Figura 5. Efecto de la coexpresión de *mGPX1* en moscas con reducción panglial de frataxina.** (A) Geotaxis negativa en moscas de 12-14 días. El silenciamiento de frataxina reduce la capacidad locomotora de las moscas. Los modelos de AF que coexpresan *mGPX1* presentan una mejoría significativa de la escalada. (B-E) Imágenes representativas de las secciones de cerebro de moscas de 35 días de edad. (F) Porcentaje de vacuolización en el tejido cerebral de moscas control y modelos. No se observa vacuolización en moscas control (B) y sí que se aprecia neurodegeneración en moscas deficientes de frataxina (C). La coexpresión de *mGPX1* en modelos de AF en *Drosophila* es responsable de la ausencia de neurodegeneración (E y cuantificación en F). Las flechas rojas señalan la presencia de vacuolas como medida de la neurodegeneración. El análisis del porcentaje de vacuolización (F) se calculó mediante T-test independiente y la significación en A se determinó mediante ANOVA de una vía con análisis *post hoc* mediante el test de comparaciones múltiples de Tukey. \* $P < 0,05$ ; \*\*\*\* $P < 0,0001$ . La escala es de 50  $\mu\text{m}$ .

### 4.3. Efecto de la inhibición farmacológica de la ferroptosis sobre los fenotipos asociados a la falta de frataxina

Los resultados positivos obtenidos con la inhibición genética nos animaron a evaluar el potencial de químicos que actúan como inhibidores de ferroptosis en nuestros modelos de *Drosophila* de la AF. Esta aproximación en modelos *in vivo* ayudaría a corroborar la hipótesis de que la ferroptosis es la causa de muerte celular en la AF (La Rosa *et al.*, 2020). Los inhibidores de ferroptosis se seleccionaron gracias a la búsqueda en la bibliografía de fármacos dadores de cisteína para regenerar glutatión que han sido empleados en *Drosophila* y cultivos celulares. Así, los fármacos elegidos fueron N-acetilcisteína (NAC) a concentraciones de 1 y 2,5 mM y N-acetilcisteína amida (NACa) a concentración de 40 µg/mL, ya que han demostrado su capacidad de regenerar la concentración de GSH, cofactor fundamental de la GPX4 para disminuir los lípidos peroxidados. NAC es un compuesto que posee un grupo sulfhidrilo, que es la forma acetilada de la L-cisteína. Después de la absorción, la NAC se metaboliza rápidamente en cisteína, la cual es un precursor directo de la producción de GSH intracelular y de la restauración de grupos tiol, regulando el estado redox (Tardiolo *et al.*, 2018). NACa es un derivado sintético de NAC que penetra mejor la membrana plasmática debido al carácter lipófilo que le proporciona la amida, neutralizando la carga negativa del grupo carboxilo (Wu *et al.*, 2006). Además ha sido empleado en el tratamiento de una gran variedad de trastornos neurológicos (Shahripour *et al.*, 2014). La baja toxicidad de NACa lo convierten en un candidato potencial para los trastornos neurodegenerativos debido a su capacidad de atravesar eficientemente la barrera hematoencefálica (Offen *et al.*, 2004).

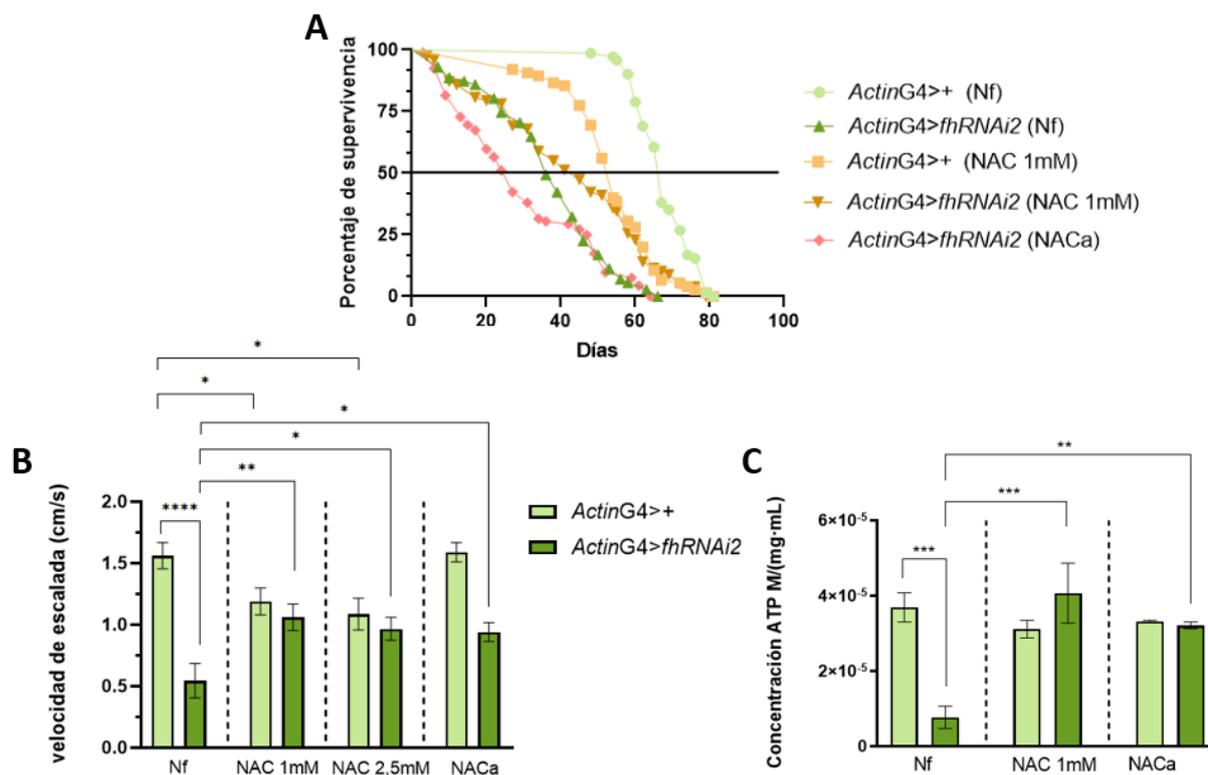
El primer paso fue evaluar si los fármacos eran capaces de incrementar la supervivencia de adultos con deficiencia sistémica de frataxina, ya que reproduce mejor las condiciones del paciente. Se analizó la vida media y máxima tanto de moscas control como de moscas con expresión reducida de frataxina en condiciones normales y tratadas con NAC 1mM y NACa 40 µg/mL. Se observó que en condiciones normales la interferencia de frataxina dio como resultado un acortamiento de la esperanza de vida media (36 días) y máxima (66 días) un 45 % y un 22,7 %, respectivamente, en comparación con los controles, cuya vida media fue de 66 días y la vida máxima de 81 días (Figura 6A). Por un lado, el tratamiento con NAC 1mM supuso un aumento del 12,2 % de la vida media (43 días) y un 19,7 % de la vida máxima (79 días) respecto el modelo de AF sin tratar. La forma de la curva muestra como en los 30 primeros días el tratamiento con NAC 1mM no tuvo apenas efecto, pero a una edad más adulta sí que se observó rescate. Por otro lado, la suplementación con NACa resultó en una vida media de 25 días y una vida máxima de 64 en moscas deficientes de frataxina, lo que en comparación con las no tratadas supuso una disminución significativa de la vida media del 30,5 %. La vida máxima

es prácticamente idéntica, lo que sugiere que en edades tempranas el fármaco no tuvo efecto y no consiguió mejorar la fisiología de la enfermedad.

Otro de los aspectos clave en la fisiopatología de la AF es la pérdida de la locomoción, por lo que es de interés comprobar si los tratamientos farmacológicos son capaces de recuperar la capacidad de escalada en moscas con déficit de frataxina de forma ubicua a los 12-14 días de vida (Figura 6B). Se observó un incremento estadísticamente significativo de la movilidad con el tratamiento de NAC 1mM (94,9 %), NAC 2,5 mM (77,57 %) y NACa (72,85 %) respecto a las moscas alimentadas con comida normal (Nf). Por lo tanto, el tratamiento con fármacos inhibidores de la ferroptosis mejora la locomoción un 81,77 %. El tratamiento con NACa en moscas control no modificó la capacidad de escalada de las moscas control. Sin embargo, inesperadamente, el tratamiento con NAC disminuyó la movilidad de los controles en un 27,13 %. Estos resultados muestran como la introducción de cisteína de forma artificial en el interior celular ayuda a revertir los fenómenos patológicos asociados a la AF.

Con el fin de comprender el modo de acción de los fármacos, optamos por investigar si las mejoras observadas en la supervivencia y la capacidad locomotora de las moscas modelos de AF se debían a una mejora en la función mitocondrial mediante el aumento de la producción de ATP. Esta se encuentra altamente inhibida en la AF debido a la incapacidad de los complejos respiratorios mitocondriales de llevar a cabo su función (Napoli *et al.*, 2006). Ambos fármacos causaron un aumento significativo de la concentración de ATP en moscas de 15 días de edad con deficiencia de frataxina en todo el cuerpo (Figura 6C). El tratamiento con NAC 1mM supuso un aumento drástico de la concentración de ATP del 430 % y NACa un aumento del 318,5 %, ambos respecto a las moscas del mismo genotipo alimentadas con comida convencional. En cuanto a los controles, la concentración de ATP no sufrió grandes alteraciones. De nuevo, se corrobora el efecto beneficioso de la introducción de cisteína, con la consiguiente producción de GSH, en la función mitocondrial, ya que en conjunto aumentan la concentración del ATP un 374,5 %. Este resultado podría explicar, al menos en parte, los resultados obtenidos en la locomoción y longevidad de las moscas modelo.

Por último, el paso final fue determinar si los fármacos inhibidores de la ferroptosis eran capaces de evitar la neurodegeneración y vacuolización en el cerebro de moscas modelo de AF con reducción panglial de frataxina de 35 días de edad, así como su efecto en la capacidad motora de las moscas. Los resultados muestran que la velocidad de escalada se incrementó un 67,85 % con el tratamiento de NAC 1mM y un 143 % con el tratamiento de NACa, respecto al mismo genotipo (*RepoG4>fhRNAi1*) en comida normal (Nf). No obstante, la capacidad motora no es recuperada con una concentración más elevada de NAC, a 2,5 mM (Figura 7A). Así el uso de inhibidores de ferroptosis

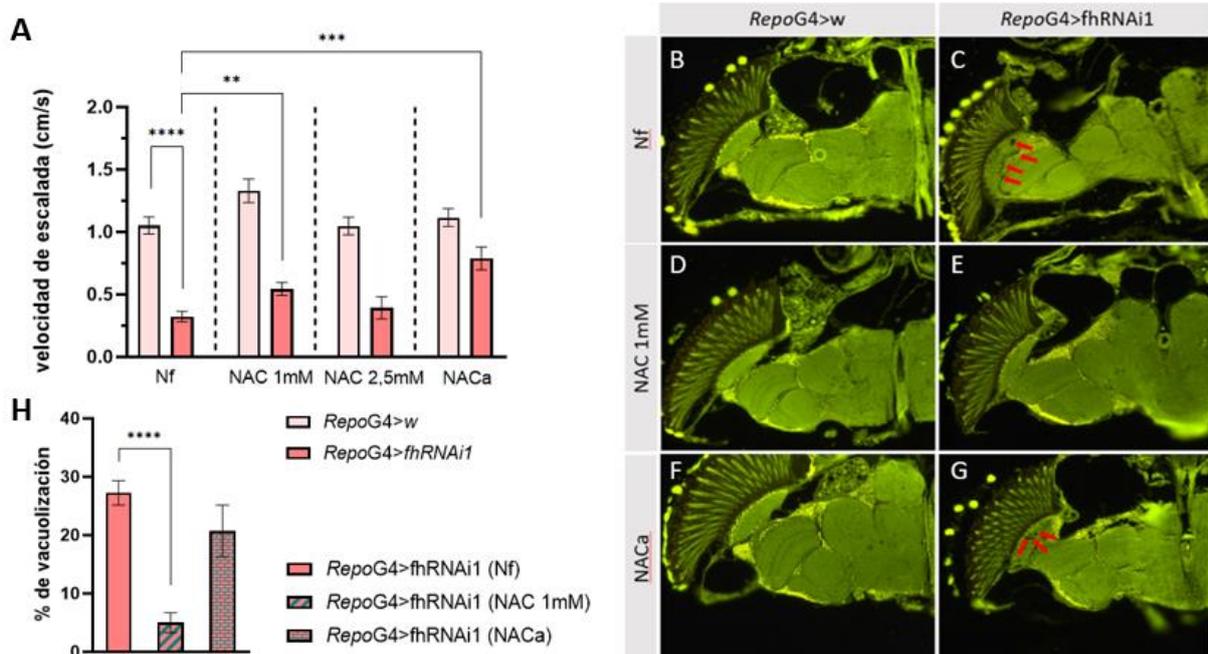


**Figura 6. Los tratamientos farmacológicos recuperan algunos de los síntomas causados por la AF en moscas modelo con interferencia sistémica de frataxina. (A)** Longevidad en moscas control y moscas modelo no tratadas (Nf) y tratadas con N-acetilcisteína (NAC) 1mM y N-acetilcisteína amida (NACa). El tratamiento con NAC 1mM mejoró la supervivencia en los estadios adultos de la mosca, mientras que NACa fue incapaz de mejorar la longevidad de las moscas modelo. **(B)** Geotaxis negativa con individuos de 12-14 días de edad. Ambos tratamientos farmacológicos mejoraron la movilidad de las moscas de AF de manera significativa. **(C)** Concentración de ATP en moscas de 15 días de edad. El tratamiento farmacológico consiguió aumentar de forma drástica la concentración de ATP en modelos de AF. Los análisis de la curva de supervivencia se realizaron mediante el test de Mantel-Cox (A) y las diferencias estadísticas en (B) y (C) se analizaron mediante ANOVA de una vía con análisis *post hoc* mediante el test de comparaciones múltiples de Tukey. Las gráficas representan la media  $\pm$  SEM. \*\*\*\* $P < 0,0001$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \* $P < 0,05$

mejoró un 105,4 % la escalada en modelos de AF donde la frataxina ha sido silenciada únicamente en la glía.

En cuanto a la integridad del cerebro, se corroboró que la falta de frataxina a nivel de la glía afectó negativamente en forma de neurodegeneración (Figura 7C), tal y como ya había mostrado nuestro grupo en otros trabajos (Navarro *et al.*, 2010). El tratamiento con NAC 1mM fue capaz de rescatar totalmente la neurodegeneración en moscas deficientes de frataxina (Figura 7E), pues no se observa visualmente ningún tipo de vacuolización en el cerebro de las moscas en comparación con aquellas que no han sido tratadas (Figura 7C). La cuantificación del área degenerada (Figura 7H) mostró que las moscas tratadas con NAC mostraban una disminución de la vacuolización del 81,5 % respecto

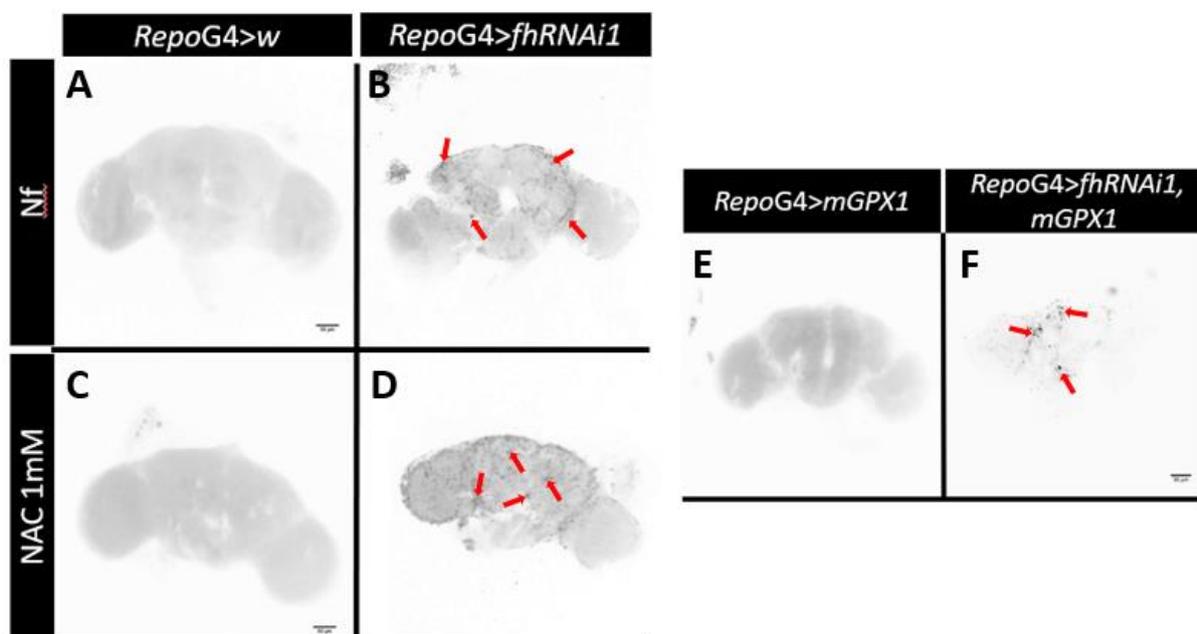
a las no tratadas. No obstante, el tratamiento con NACa no parece recuperar la degeneración neuronal debido a la presencia clara de vacuolas en la zona del quiasma (Figura 7G), siendo su cuantificación estadísticamente no significativa (Figura 7H). Las moscas sin deficiencia de frataxina no muestran neurodegeneración en ninguno de los tres casos (Figura 7B, 7D y 7F), por lo que los fármacos no muestran efectos perjudiciales sobre la mosca. Estos resultados podrían sugerir que la concentración de NACa no fuera lo suficientemente alta para evitar la neurodegeneración en etapas tardías de la enfermedad, mientras que NAC a una concentración de 1mM resultó beneficioso en moscas deficientes de frataxina en las células de la glía.



**Figura 7. Efecto del tratamiento farmacológico en moscas con reducción panglial de frataxina.** (A) Geotaxis negativa en moscas de 12-14 días. El tratamiento con N-acetilcisteína (NAC) 1mM y N-acetilcisteína amida (NACa) mejoró significativamente la capacidad de escalada, mientras que NAC 2,5 mM no mejoró la locomoción, respecto a las no tratadas (Nf). (B-G) Imágenes representativas de las secciones de cerebro en moscas de 35 días. (H) Porcentaje de vacuolización en el tejido cerebral de moscas deficientes no tratadas y tratadas farmacológicamente. El tratamiento con NAC 1mM recuperó totalmente la neurodegeneración en moscas con interferencia de frataxina (E) respecto a aquellas que no han sido tratadas farmacológicamente (C). Sin embargo, NACa no fue capaz de evitar la vacuolización en el quiasma de las moscas modelo de AF (G). Las flechas rojas señalan la presencia de vacuolas como medida de la neurodegeneración. La significancia estadística en A y el análisis del porcentaje de vacuolización (H) se realizaron mediante ANOVA de una vía con análisis *post hoc* mediante el test de comparaciones múltiples de Tukey. \*\*\*\*P<0,0001; \*\*\*P<0,001; \*\*P<0,01. La escala es de 50  $\mu$ m.

#### 4.4. No hay disminución en la cantidad de lípidos cerebrales con la inhibición farmacológica y genética de la ferroptosis

Una de las características principales de la ferroptosis es el incremento de lípidos peroxidados, aspecto que también está presente en los modelos de *Drosophila* de AF (Monnier *et al.*, 2018). Sin embargo, este defecto va también acompañado de la acumulación de lípidos y de gotas de lípidos en las células gliales. Esta alteración del metabolismo lipídico está asociado a una disminución de la esperanza de vida, una mayor vulnerabilidad a los efectos perjudiciales de los radicales libres, efectos neurodegenerativos y un deterioro grave de la actividad locomotora (Navarro *et al.*, 2010). Por esto, se estudió paralelamente si la coexpresión de *mGPX1* o la suplementación farmacológica con NAC 1mM en líneas de ARNi para la supresión dirigida de frataxina en la glía de *Drosophila* eran capaces de revertir este fenotipo. Para ello, se llevó a cabo la disección del cerebro de las moscas de 30 días y posteriormente fueron teñidas con la tinción de lípidos neutros BODIPY 495. Se observó como la cantidad de lípidos en moscas deficientes de frataxina sin tratar es mucho mayor (Figura 8B) que en aquellas que no presentan la enfermedad (Figura 8A), en cuya superficie no se observan los puntos negros representando las gotas de lípidos. No obstante, emplear inhibidores ferroptóticos en estos modelos no supuso una disminución en la cantidad de lípidos totales en la superficie del cerebro, ni



**Figura 8.** La cantidad de lípidos neutros no es disminuida con el tratamiento farmacológico y genético de los modelos de AF con reducción de frataxina en la glía. La deficiencia de frataxina provoca la presencia de lípidos en el cerebro (B), respecto al control (A). Los inhibidores ferroptóticos empleados fueron el tratamiento farmacológico con N-acetilcisteína (NAC) 1mM, que no tuvo ningún efecto (D), y la coexpresión génica de la glutatión peroxidasa de ratón 1 (*mGPX1*), la cual no consiguió tampoco reducir la cantidad de lípidos (F). Las flechas rojas señalan la presencia de lípidos teñidos. La escala es de 50  $\mu$ m.

con la coexpresión de la GPx (Figura 8F), ni al suplementar la comida con el químico NAC 1mM (Figura 8D), respecto a los controles de cada condición (Figura 8E y Figura 8C, respectivamente). Este resultado podría confirmar la hipótesis de que los inhibidores empleados tienen como función disminuir la cantidad de lípidos peroxidados, pero no la cantidad absoluta de lípidos neutros.

## 5. DISCUSIÓN

La ataxia de Friedreich es la ataxia hereditaria recesiva más frecuente en la población caucásica y es producida por un déficit en la síntesis de la proteína mitocondrial frataxina. Aunque su función no se ha comprendido completamente, hay una sólida evidencia que respalda su participación en la formación de CFS (Fox *et al.*, 2019). Las diversas funciones de los CFS como grupos prostéticos resultan en manifestaciones pleiotrópicas y multiorgánicas en el caso de la AF. Aunque actualmente no hay una cura efectiva para la AF, se están produciendo emocionantes avances terapéuticos que se enfocan en diferentes partes de la cascada patológica (Zhang & Napierala, 2019).

Este trabajo se ha centrado en la evaluación de la inhibición de la ferroptosis, farmacológica y genéticamente, en modelos de *Drosophila melanogaster* como posible estrategia terapéutica de la AF. La ferroptosis es una forma recientemente descrita de muerte celular programada inducida por hierro que es bioquímicamente diferente de la apoptosis. La desregulación del metabolismo del hierro, la depleción de glutatión y la acumulación de peróxidos de lípidos se han descrito como participantes principales en este tipo de muerte celular (Xie *et al.*, 2016). Se ha informado de una fuerte relación entre la ferroptosis y la neurodegeneración, sobre todo en la enfermedad de la AF (La Rosa *et al.*, 2020). No obstante, la caracterización del tipo de muerte celular como consecuencia de la enfermedad no ha sido resuelta pues la evidencia científica demuestra que existen marcadores apoptóticos en modelos celulares de la AF (Palomo *et al.*, 2011), pero nunca ha llegado a dar el salto a organismos pluricelulares (Simon *et al.*, 2004). Por lo tanto, es necesario estudiar los marcadores ferroptóticos en organismos complejos para corroborar lo observado *in vitro*, entendiendo así los mecanismos subyacentes a la muerte celular en organismos pluricelulares con AF.

En este estudio observamos que no había diferencia en la expresión de los genes apoptóticos *reaper*, *hid* y *Diap1* en moscas control y deficientes de frataxina de 7 días de edad, relacionado con el estado presintomático de la enfermedad. No obstante, en moscas de 30 días de edad, cuando las moscas ya muestran claramente los síntomas, el gen *reaper* se encuentra sobreexpresado. En otros trabajos del mismo laboratorio se estudió la expresión de estos genes en moscas de 20 días de edad y no se observó diferencia significativa (Pascual, 2022). Los marcadores proapoptóticos en *Drosophila* han sido ampliamente estudiados y estos muestran que la expresión de *reaper* o *hid* por si solos no induce de manera eficiente la muerte celular de la línea media celular del sistema nervioso central del embrión de *Drosophila*. Así, *reaper* y *hid* se expresan y cooperan juntos de forma sinérgica para inducir la apoptosis (Zhou *et al.*, 1997). Por este motivo, no podemos confirmar que en moscas de 30 días se esté llevando a cabo la apoptosis debido a la sobreexpresión de solo uno de los dos genes. No obstante, esto no descarta que en moscas de mayor edad la patología de la enfermedad desencadene varias rutas de muerte celular. Se sugiere entonces que en los primeros días de vida y durante parte de su

edad adulta en el que las moscas deficientes de frataxina empiezan a morir, siendo su vida media de 36 días, es otro tipo de muerte celular la responsable. Por lo tanto, debido a la presencia de los marcadores ferroptóticos en nuestros modelos de *Drosophila* y en otros trabajos del grupo (Pascual, 2022), este tipo de muerte celular dependiente de hierro podría ser un buen candidato.

El siguiente paso fue estudiar si interviniendo en las principales vías de señalización involucradas en la ferroptosis (sistema Xc- y GPX4) se podría conseguir revertir el fenotipo asociado a la AF en modelos de *D. melanogaster*. Para ello se han empleado inhibidores de ferroptosis que han resultado eficientes en modelos *in vivo* de la AF (Chiang *et al.*, 2020) o en estudios relacionados con enfermedades cuyas manifestaciones patológicas son similares a la AF (Li *et al.*, 2022; Banaclocha, 2000). Por un lado, el papel de GPX4 como regulador principal en el proceso de la ferroptosis se basa en su capacidad de reducir complejos hidroperóxidos a sus correspondientes alcoholes mientras que oxida el GSH en disulfuro de glutatión, impidiendo así la reacción en cadena de la peroxidación lipídica. La importancia de *GPX4* se demostró en modelos de ratón KIKO de frataxina ya que su expresión se redujo notablemente, lo que provoca la progresión de la enfermedad y la disminución de las defensas antioxidantes (Turchi *et al.*, 2020). En la mosca de la fruta, el único homólogo de la peroxidasa es GTPx1, el cual tiene actividad tiorredoxina peroxidasa y es el encargado de mantener el equilibrio redox intracelular (Missirlis *et al.*, 2003). No obstante, en un estudio del grupo en el que se sobreexpresó *GTPx1* en *Drosophila* se demostró que aumentar la actividad tiorredoxina no fue suficiente para controlar el desequilibrio redox que genera la falta de frataxina en la mitocondria y, por lo tanto, la peroxidación lipídica (Pascual, 2022). Por lo tanto, con el objetivo de contrarrestar el estrés oxidativo que ocasiona el déficit de cofactores CSF se plantean dos aproximaciones: (i) coexpresar *mGPX1*, cuya actividad es neuroprotectora en modelos de *Drosophila* de la enfermedad de Huntington (Mason *et al.*, 2013) y (ii) aumentar la concentración de cisteína en el interior celular de forma artificial para potenciar la capacidad antioxidante de la célula a través de la actividad endógena de GTPx1, empleando el GSH sintetizado.

Los resultados obtenidos sugieren que las GPx tienen un papel muy importante en el cerebro debido a su papel neuroprotector, que se observa en la superficie cerebral al reducir prácticamente al completo la vacuolización, siendo la neurodegeneración eliminada. Además, su capacidad locomotora aumenta drásticamente respecto a las que no expresan *mGPX1*. Estos resultados coinciden con lo observado en Mason *et al.* (2013), ya que la coexpresión de *mGPX1* en modelos de Huntington mejoró la actividad locomotora y la neurodegeneración, así como la arritmia circadiana. No obstante, en condiciones más próximas a las que ocurre en humanos, en las que la expresión de frataxina es deficiente en todo el cuerpo, una sobreexpresión de *mGPX1* ubicua no parece mejorar la locomoción de las moscas. Este resultado sugiere que cada tejido responde diferente a la falta de frataxina, por lo

que la cantidad de lípidos peroxidados en la glía es más crítica que en otros tejidos del cuerpo (Navarro *et al.*, 2010). Así, la actividad de *mGPX1* es más efectiva en la glía y consigue mejorar la locomoción y la neurodegeneración. También demostramos que la función mitocondrial es mejorada, por lo que confirmamos el papel de las GPx en el mantenimiento de la homeostasis en el interior de las mitocondrias y podría ser un potencial tratamiento terapéutico como sustitución de la función de la frataxina.

Existe una amplia gama de evidencias y ensayos clínicos que resaltan la importancia fundamental de los antioxidantes en la AF (Rodríguez *et al.*, 2020b). En este estudio, se ha empleado la NAC debido a su papel reconocido antioxidante y antiinflamatorio utilizado para contrarrestar enfermedades neurodegenerativas y psiquiátricas. La síntesis de GSH está limitada por la disponibilidad de sustratos, siendo la cisteína el precursor limitante. El tratamiento único con GSH no es suficiente para recuperar sus niveles debido a su rápido metabolismo, mientras que la NAC es capaz de atravesar las barreras, introducir cisteína y aumentar la concentración de GSH (Tardiolo *et al.*, 2018). Estudios previos muestran como la aplicación de NAC en *beagles* con nefropatía diabética redujo el proceso de la ferroptosis (Li *et al.*, 2022) y en *D. melanogaster* mejoró la supervivencia y la capacidad locomotora a concentraciones de 10nM a 1mM, siendo concentraciones más altas tóxicas (Shaposhnikov *et al.*, 2018). En modelos de AF de *Drosophila* generados a partir de la inserción mediante CRISPR/Cas9 de aproximadamente 200 GAA en el intrón del gen *fh*, emplearon NAC como tratamiento a una concentración de 5mM y observaron mejoras significativas en la supervivencia, función locomotora, resistencia al estrés oxidativo y en la actividad de la aconitasa (Russi *et al.*, 2020). No obstante, en otros trabajos, una concentración de NAC de 5mM resultó en una disminución de la longevidad de las moscas (Pascual, 2022). Por lo tanto, en nuestros experimentos evaluamos concentraciones de 1mM y 2,5 mM. La concentración de 2,5 mM fue descartada rápidamente debido a la falta de rescate de la locomoción en moscas deficientes de frataxina en la zona panglial, por lo que el resto de los experimentos se llevaron a cabo con NAC 1mM. Este fármaco aumentó la vida media (12,2 %) y máxima (19,7 %) de las moscas deficientes de frataxina, principalmente en un estadio más envejecido de la mosca en el que la enfermedad ha sido desarrollada completamente, lo que concuerda con la disminución de la neurodegeneración observada en moscas de 35 días de edad. No obstante, resulta extraño que el tratamiento con NAC en moscas control supuso una disminución del 19,7 % de la vida media, por lo que en etapas tempranas de las moscas parece resultar tóxico. Este resultado es contrario al expuesto en Niraula y Kim (2019), que incluso empleando una concentración de 5mM la supervivencia de las moscas con o sin tratamiento es idéntica. Esto podría explicar que en moscas deficientes de frataxina, en los primeros días el fármaco tenga un efecto tóxico y aquellas que sobreviven a este estrés son capaces de mejorar las manifestaciones patológicas de la enfermedad.

De acuerdo con los resultados del presente estudio, NAC consiguió mejorar la velocidad de escalada tanto en moscas deficientes de frataxina de forma ubicua como en la glía, así como la concentración de ATP, tal y como había sido informado en estudios previos (Russi *et al.*, 2020; Pascual, 2022). Estos resultados apoyan la hipótesis de que la introducción artificial de cisteína en el interior de las células provoca un aumento de la concentración de GSH que es empleada por GTPX1 para contrarrestar el estrés redox que genera la falta de frataxina.

Aunque la NAC ha sido probada en varios modelos *in vivo* e *in vitro* y hemos comprobado que tiene efectos beneficiosos en la AF, diferentes estudios informan que su biodisponibilidad e hidrofobicidad son una de principales limitaciones para potenciar al máximo sus beneficios sobre las enfermedades asociadas al estrés oxidativo (Shahripour *et al.*, 2014). Es por este motivo que empleamos un derivado amida de NAC (NACa) que ha demostrado su capacidad de atravesar la membrana hematoencefálica gracias a su lipofilicidad y que es un potencial tratamiento en trastornos neurológicos (Sunitha *et al.*, 2013). La capacidad de disminuir el estrés oxidativo de NACa ha sido testada en modelos *in vitro* e *in vivo* (Schimel *et al.*, 2011; Amer *et al.*, 2008). Nosotros administramos NACa a concentraciones de 40 µg/mL en referencia a lo observado en otros modelos de AF en *Drosophila* en Chen *et al.* (2016) y en moscas de la fruta mutantes para la acumulación de lípidos en la glía, cuyo efecto fue neuroprotector (Liu *et al.*, 2015). Nuestros experimentos revelaron que NACa no mejoraba la supervivencia de las moscas deficientes de frataxina, mientras que en un estudio en el que inducían con un insecticida estrés oxidativo, a concentraciones de 75 µg/mL mejoraba significativamente la supervivencia (Martelli *et al.*, 2020). Por lo tanto, es posible que la concentración utilizada sea demasiado baja para observar un efecto positivo en la fisiología de la mosca. Además, en nuestro escenario experimental, NACa mejoró la capacidad de escalada de las moscas con interferencia de frataxina tanto de forma ubicua como en la glía significativamente, de una forma más pronunciada que NAC. Estos efectos concuerdan con el aumento en la concentración de ATP observada, por lo que se confirma el papel de los inhibidores de ferroptosis en la reducción del estrés oxidativo y en el correcto funcionamiento de la actividad mitocondrial. No obstante, el papel neuroprotector de la NACa a una concentración de 40 µg/mL ha demostrado capacidades limitadas en nuestro escenario, del mismo modo que tampoco había resultado efectiva en otro modelo de la enfermedad (Chen *et al.*, 2016). De nuevo, parece que la concentración del fármaco es crucial para revertir los fenotipos neurológicos asociados a la AF. Este resultado también puede estar condicionado a la suplementación farmacológica de NACa en la etapa adulta de la mosca y no desde el estado de larva como el caso de NAC. A pesar de los beneficios en el adulto, NACa presentaba cierta toxicidad para las moscas modelo durante el desarrollo. Por lo tanto, en el caso de NAC 2,5 mM y NACa es posible que sus niveles reduzcan demasiado el estrés oxidativo en las primeras etapas de la enfermedad en la

que los niveles de ROS no son demasiados elevados. Esto respaldaría la teoría de la mitohormesis, la cual determina que unos niveles basales de ROS dentro de las mitocondrias mantienen en constante activación al sistema antioxidante y favorece a una mayor resistencia al estrés cuando la enfermedad ya es del todo desarrollada (Ristow & Zarse, 2010).

Si el desequilibrio de los lípidos es un factor clave en la enfermedad de la AF en la mosca de la fruta y los peróxidos lipídicos son la causa principal de los síntomas, existe la posibilidad de reducir los efectos negativos de la pérdida de frataxina mediante la regulación de los niveles de lípidos y/o la cantidad de lípidos peroxidados presentes (Navarro *et al.*, 2010). Así, mediante los inhibidores de la ferroptosis empleados esperábamos que se contrarrestasen estas condiciones. No obstante, ni la coexpresión de *mGPX1* ni el tratamiento con NAC 1mM supuso una disminución del contenido lipídico en el cerebro de las moscas. Este resultado sugiere que los inhibidores empleados están destinados a tratar la ferroptosis en las moscas y, por lo tanto, a eliminar una de sus principales causas, los lípidos peroxidados. Por lo tanto, la cantidad de lípidos neutros no es restaurada pero sí la cantidad de peróxidos lipídicos. Sería necesario llevar a cabo una serie de procesos experimentales tales como la tinción de los lipoperóxidos con el colorante BODIPY 581/591 C11, con anticuerpos específicos o con el ensayo espectrofotométrico LPO-586 (OxisResearch), que cuantifica la cantidad de MDA en la mosca (Cotticelli *et al.*, 2013; Navarro *et al.*, 2010) para corroborar dicha hipótesis.

Debido a la capacidad de NAC y NACa de regenerar la cantidad de GSH necesaria para la detoxificación de los lípidos peroxidados mediante la acción de GPx, como por ejemplo *mGPX1*, sería interesante estudiar la combinación de ambos inhibidores ferroptóticos en modelos de deficiencia de frataxina para comprobar si la actividad conjunta consigue mejorar aún más los fenotipos asociados a la AF.

En conjunto, debido a las capacidades observadas para rescatar la longevidad, locomoción y neurodegeneración en modelos de AF de los inhibidores ferroptóticos genéticos y farmacológicos, se apoya la hipótesis de que sea la ferroptosis la causa de muerte celular. Además, estos inhibidores se podrían convertir en potenciales tratamientos terapéuticos para la ataxia de Friedreich en un futuro.

## 6. CONCLUSIONES

Sobre el estudio del efecto de los inhibidores ferroptóticos en las manifestaciones patológicas de la ataxia de Friedreich en modelos *in vivo* de *Drosophila melanogaster* sacamos las siguientes conclusiones:

- No hemos encontrado una alteración en marcadores de apoptosis a excepción de *reaper*, incluso a los 30 días cuando los fenotipos de la enfermedad son evidentes en las moscas deficientes en frataxina. Por ello, es muy probable que otras formas de muerte celulares sean relevantes en los modelos de *Drosophila* de AF.
- La inhibición genética de la ferroptosis mediante la expresión del gen de ratón *mGPX1* y la inhibición farmacológica mediante NAC o NACa han sido suficientes para rescatar algunos fenotipos provocados por la deficiencia de frataxina como la longevidad, locomoción y neurodegeneración.
- Sigue siendo un factor importante establecer la concentración óptima de cada fármaco para evitar altas concentraciones que puedan resultar tóxicas o concentraciones demasiado bajas que carezcan de capacidad terapéutica.
- Los tratamientos empleados, así como la expresión de *mGPX1*, se han demostrado incapaces de reducir los niveles de lípidos en el cerebro, lo cual podría indicar que su mecanismo de actuación es influir sobre la cantidad de lípidos peroxidados, principal causante de la ferroptosis.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

ABETI, R.; PARKINSON, M. H.; HARGREAVES, I. P.; ANGELOVA, P. R.; SANDI, C.; POOK, M. A.; GIUNTI, P.; & ABRAMOV, A. Y. (2016). «Mitochondrial energy imbalance and lipid peroxidation cause cell death in Friedreich's ataxia». *Cell Death and Disease*, 7(5), e2237. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.111>

AMER, J.; ATLAS, D.; & FIBACH, E. (2008). N-acetylcysteine amide (AD4) attenuates oxidative stress in beta-thalassemia blood cells. *Biochimica Et Biophysica Acta - General Subjects*, 1780(2), 249-255. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2007.11.009>

ARANCA, T. V.; JONES, T.; SHAW, J.; STAFFETTI, J.; ASHIZAWA, T.; KUO, S.; FOGEL, B. L.; WILMOT, G.; PERLMAN, S.; ONYIKE, C. U.; YING, S. H.; & ZESIEWICZ, T. A. (2016). Emerging therapies in Friedreich's ataxia. *Neurodegenerative disease management*, 6(1), 49-65. <https://doi.org/10.2217/nmt.15.73>

BANACLOCHA, M. A. M. (2000). N-acetylcysteine elicited increase in complex I activity in synaptic mitochondria from aged mice: Implications for treatment of Parkinson's Disease. *Brain Research*, 859(1), 173-175. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(00\)02005-9](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(00)02005-9)

BIDICHANDANI, S. I.; ASHIZAWA, T.; & PATEL, P. (1998). The GAA Triplet-Repeat Expansion in Friedreich Ataxia Interferes with Transcription and May Be Associated with an Unusual DNA Structure. *American Journal of Human Genetics*, 62(1), 111-121. <https://doi.org/10.1086/301680>

BRAND, A. H.; & PERRIMON, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, 118(2), 401-415. <https://doi.org/10.1242/dev.118.2.401>

BULTEAU, A.; PLANAMENTE, S.; JORNEA, L.; DUR, A.; LESUISSE, E.; CAMADRO, J.; & AUCHERE, F. (2012). Changes in mitochondrial glutathione levels and protein thiol oxidation in  $\Delta yfh1$  yeast cells and the lymphoblasts of patients with Friedreich's ataxia. *Biochimica Et Biophysica Acta: Molecular Basis Of Disease*, 1822(2), 212-225. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.11.003>

CALAP-QUINTANA, P.; NAVARRO, J. E. G.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, J.; MARTÍNEZ-SEBASTIÁN, M. J.; MOLTÓ, M. D.; & LLORENS, J. V. (2018). *Drosophila melanogaster* Models of Friedreich's Ataxia. *BioMed Research International*, 2018, 1-20. <https://doi.org/10.1155/2018/5065190>

CAMPUZANO, V.; MONTERMINI, L.; MOLTÓ, M. D.; PIANESE, L.; COSSÉE, M.; CAVALCANTI, F.; MONROS, E.; RODIUS, F.; DUCLOS, F.; MONTICELLI, A.; ZARA, F.; CAÑIZARES, J.; KOUTNIKOVA, H.; BIDICHANDANI, S. I.; GELLERA, C.; BRICE, A.; TROUILLAS, P.; DE MICHELE, G.; FILLA, A.; . . . PANDOLFO, M. (1996). Friedreich's Ataxia: Autosomal Recessive Disease Caused by an Intronic GAA Triplet Repeat Expansion. *Science*, 271(5254), 1423-1427. <https://doi.org/10.1126/science.271.5254.1423>

CAÑIZARES, J.; BLANCA, J.; NAVARRO, J. C.; MONROS, E.; PALAU, F.; & MOLTÓ, M. D. (2000). dfh is a Drosophila homolog of the Friedreich's ataxia disease gene. *Gene*, 256(1-2), 35-42. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(00\)00343-7](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(00)00343-7)

CASTALDO, I.; PINELLI, M.; MONTICELLI, A.; ACQUAVIVA, F.; GIACCHETTI, M.; FILLA, A.; SACCHETTI, S. B.; KELLER, S.; AVVEDIMENTO, V. E.; CHIARIOTTI, L.; & COCOZZA, S. (2008). DNA methylation in intron 1 of the frataxin gene is related to GAA repeat length and age of onset in Friedreich ataxia patients. *Journal of Medical Genetics*, 45(12), 808-812. <https://doi.org/10.1136/jmg.2008.058594>

CHEN, K.; LIN, G.; HAELTERMAN, N. A.; HO, T. L.; LI, T.; LI, Z.; DURAINÉ, L.; GRAHAM, B. H.; JAISWAL, M.; YAMAMOTO, S.; RASBAND, M. N.; & BELLEN, H. J. (2016). Loss of Frataxin induces iron toxicity, sphingolipid synthesis, and Pdk1/Mef2 activation, leading to neurodegeneration. *eLife*, 5. <https://doi.org/10.7554/elife.16043>

CHIANG, S.; HUANG, M. L.; & RICHARDSON, D. J. (2020). Treatment of dilated cardiomyopathy in a mouse model of Friedreich's ataxia using N-acetylcysteine and identification of alterations in microRNA expression that could be involved in its pathogenesis. *Pharmacological Research*, 159, 104994. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104994>

CHUTAKE, Y. K.; COSTELLO, W. N.; LAM, C.; & BIDICHANDANI, S. I. (2014). Altered Nucleosome Positioning at the Transcription Start Site and Deficient Transcriptional Initiation in Friedreich Ataxia. *Journal of Biological Chemistry*, 289(22), 15194-15202. <https://doi.org/10.1074/jbc.m114.566414>

COOK, A.; & GIUNTI, P. (2017). Friedreich's ataxia: clinical features, pathogenesis and management. *British Medical Bulletin*, 124(1), 19-30. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldx034>

COSSÉE, M.; DURR, A.; SCHMITT, M.; DAHL, N.; TROUILLAS, P.; ALLINSON, P.; KOSTRZEWA, M.; A, N.; GUSTAVSON, K.; KOHLSCHÜTTER, A.; MÜLLER, U. A.; MANDEL, J.; BRICE, A.; KOENIG, M.; CAVALCANTI, F.; TAMMARO, A.; DE MICHELE, G.; FILLA, A.; COCOZZA, S.; . . . PANDOLFO, M. (1999). Friedreich's ataxia: Point mutations and clinical presentation of compound heterozygotes. *Annals of Neurology*, 45(2), 200-206. [https://doi.org/10.1002/1531-8249\(199902\)45:2](https://doi.org/10.1002/1531-8249(199902)45:2)

COSTA, I.; BARBOSA, D. J.; SILVA, V.; BENFEITO, S.; BORGES, F.; REMIÃO, F.; & SILVA, R. (2023). Research Models to Study Ferroptosis's Impact in Neurodegenerative Diseases. *Pharmaceutics*, 15(5), 1369. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15051369>

COTTICELLI, M. G.; CRABBE, A. M.; WILSON, R.; & SHCHEPINOV, M. S. (2013). Insights into the role of oxidative stress in the pathology of Friedreich ataxia using peroxidation resistant polyunsaturated fatty acids. *Redox biology*, 1(1), 398-404. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.06.004>

DELATYCKI, M. B.; & BIDICHANDANI, S. I. (2019). Friedreich ataxia- pathogenesis and implications for therapies. *Neurobiology of Disease*, 132, 104606. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104606>

DIXON, S. J.; LEMBERG, K. M.; LAMPRECHT, M. R.; SKOUTA, R.; ZAITSEV, E. M.; GLEASON, C. E.; PATEL, D. N.; BAUER, A. J.; CANTLEY, A. M.; YANG, W.; MORRISON, B.; & STOCKWELL, B. R. (2012). Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death. *Cell*, 149(5), 1060-1072. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.042>

DODSON, M.; CASTRO-PORTUGUEZ, R.; & ZHANG, D. D. (2019). NRF2 plays a critical role in mitigating lipid peroxidation and ferroptosis. *Redox biology*, 23, 101107. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101107>

DU, J.; ZHOU, Y.; LI, Y.; XIA, J.; CHEN, Y.; CHEN, S.; WANG, X.; SUN, W.; WANG, T.; REN, X.; WANG, X.; AN, Y.; LU, K.; HU, W.; HUANG, S.; LI, J.; TONG, X.; & WANG, Y. (2020). Identification of Frataxin as a regulator of ferroptosis. *Redox Biology*, 32, 101483. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101483>

EMOND, M.; LEPAGE, G.; VANASSE, M.; & PANDOLFO, M. (2000). Increased levels of plasma malondialdehyde in Friedreich ataxia. *Neurology*, 55(11), 1752-1753. <https://doi.org/10.1212/wnl.55.11.1752>

FOX, N. C.; YUE, W. W.; FENG, X.; BAILEY, H.; MARTELLI, A.; NABHAN, J. F.; STRAIN-DAMERELL, C.; BULAWA, C.; YUE, W. W.; & HAN, S. (2019). Structure of the human frataxin-bound iron-sulfur cluster assembly complex provides insight into its activation mechanism. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09989-y>

IGOILLO-ESTEVE, M.; GURGUL-CONVEY, E.; HU, A.; SANTOS, L. R. B. D.; ABDULKARIM, B.; CHINTAWAR, S.; MARSELLI, L.; MARCHETTI, P.; JONAS, J.; EIZIRIK, D. L.; PANDOLFO, M.; & CNOP, M. (2014). Unveiling a common mechanism of apoptosis in  $\beta$ -cells and neurons in Friedreich's ataxia. *Human Molecular Genetics*, 24(8), 2274-2286. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu745>

KOEPPEN, A. H. (2011). Friedreich's ataxia: Pathology, pathogenesis, and molecular genetics. *Journal of the Neurological Sciences*, 303(1-2), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2011.01.010>

KOEPPEN, A. H.; & MAZURKIEWICZ, J. E. (2013). Friedreich Ataxia: Neuropathology Revised. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 72(2), 78-90. <https://doi.org/10.1097/nen.0b013e31827e5762>

KOEPPEN, A. H.; RAMIREZ, R. L.; BECKER, A. B.; BJORK, S. J.; LEVI, S.; SANTAMBROGIO, P.; PARSONS, P. J.; KRUGER, P. C.; YANG, K. X.; FEUSTEL, P. J.; & MAZURKIEWICZ, J. E. (2015). The

Pathogenesis of Cardiomyopathy in Friedreich Ataxia. *PLOS ONE*, 10(3), e0116396. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116396>

LA ROSA, P.; PETRILLO, S.; FIORENZA, M. T.; BERTINI, E.; & PIEMONTE, F. (2020). Ferroptosis in Friedreich's Ataxia: A Metal-Induced Neurodegenerative Disease. *Biomolecules*, 10(11), 1551. <https://doi.org/10.3390/biom10111551>

LABUDA, M.; LABUDA, D.; MIRANDA, C. H.; POIRIER, J.; SOONG, B.; BARUCHA, N.; & PANDOLFO, M. (2000). Unique origin and specific ethnic distribution of the Friedreich ataxia GAA expansion. *Neurology*, 54(12), 2322-2324. <https://doi.org/10.1212/wnl.54.12.2322>

LECOCQ, C.; CHARLES, P.; AZULAY, J.; MEISSNER, W. G.; RAI, M.; NGUYEN, K.; PÉREON, Y.; FABRE, N.; ROBIN, E. E.; COURTOIS, S.; GUYANT-MARÉCHAL, L.; ZAGNOLI, F.; RUDOLF, G.; RENAUD, M.; SÉVIN-ALLOUET, M. M.; LESNE, F.; ALAERTS, N. N.; GOIZET, C.; CALVAS, P.; . . . ANHEIM, M. (2015). Delayed-onset Friedreich's ataxia revisited. *Movement Disorders*, 31(1), 62-69. <https://doi.org/10.1002/mds.26382>

LI, J.; CAO, F.; YIN, H.; HUANG, Z.; LIN, Z.; MAO, N.; SUN, B.; & WANG, G. (2020). Ferroptosis: past, present and future. *Cell Death and Disease*, 11(2). <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2298-2>

LI, Q.; LIAO, J.; CHEN, W.; ZHANG, K.; LI, H.; MA, F.; ZHANG, H.; HAN, Q.; GUO, J.; LI, Y.; HU, L.; PAN, J.; & TANG, Z. (2022). NAC alleviates ferroptosis in diabetic nephropathy via maintaining mitochondrial redox homeostasis through activating SIRT3-SOD2/Gpx4 pathway. *Free Radical Biology and Medicine*, 187, 158-170. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2022.05.024>

LIU, L. Q.; ZHANG, K.; SANDOVAL, H.; YAMAMOTO, S.; JAISWAL, M.; SANZ, E.; LI, Z.; HUI, J.; GRAHAM, B. H.; QUINTANA, A.; & BELLEN, H. J. (2015). Glial lipid droplets and ROS induced by mitochondrial defects promote neurodegeneration. *Cell*, 160(1-2), 177-190. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.12.019>

LIVAK, K. J.; & SCHMITTGEN, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods*, 25(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

LLORENS, J. L. M.; NAVARRO, J. C.; MARTÍNEZ-SEBASTIÁN, M. J.; BAYLIES, M. K.; SCHNEUWLY, S.; BOTELLA, J. R.; & MOLTÓ, M. C. C. (2007). Causative role of oxidative stress in a *Drosophila* model of Friedreich ataxia. *The FASEB Journal*, 21(2), 333-344. <https://doi.org/10.1096/fj.05-5709com>

LYNCH, D. A.; CHIN, M. H.; BOESCH, S.; DELATYCKI, M. B.; GIUNTI, P.; GOLDSBERRY, A.; HOYLE, J. C.; MARIOTTI, C.; MATHEWS, K. D.; NACHBAUER, W.; O'GRADY, M.; PERLMAN, S.; SUBRAMONY, S.; WILMOT, G.; ZESIEWICZ, T. A.; & MEYER, C. J. (2022). Efficacy of Omaveloxolone in Friedreich's Ataxia:

Delayed-Start Analysis of the MOXIe Extension. *Movement Disorders*, 38(2), 313-320. <https://doi.org/10.1002/mds.29286>

LYNCH, D. A.; & FARMER, G. (2021). Mitochondrial and metabolic dysfunction in Friedreich ataxia: update on pathophysiological relevance and clinical interventions. *Neuronal signaling*, 5(2). <https://doi.org/10.1042/ns20200093>

MARTELLI, F.; ZHONGYUAN, Z.; WANG, J. S.; WONG, C.; KARAGAS, N. E.; ROESSNER, U.; RUPASINGHE, T.; VENKATACHALAM, K.; PERRY, T.; BELLEN, H. J.; & BATTERHAM, P. J. (2020). Low doses of the neonicotinoid insecticide imidacloprid induce ROS triggering neurological and metabolic impairments in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(41), 25840-25850. <https://doi.org/10.1073/pnas.2011828117>

MASON, R. J.; CASU, M.; BUTLER, N. J.; BREDI, C.; CAMPESAN, S.; CLAPP, J.; GREEN, E. C.; DHULKHED, D.; KYRIACOU, C. P.; & GIORGINI, F. (2013). Glutathione peroxidase activity is neuroprotective in models of Huntington's disease. *Nature Genetics*, 45(10), 1249-1254. <https://doi.org/10.1038/ng.2732>

MISSIRLIS, F.; RAHLFS, S.; DIMOPOULOS, N.; BAUER, H.; BECKER, K.; HILLIKER, A. J.; PHILLIPS, J. A.; & JÄCKLE, H. (2003). A Putative Glutathione Peroxidase of *Drosophila* Encodes a Thioredoxin Peroxidase That Provides Resistance against Oxidative Stress But Fails to Complement a Lack of Catalase Activity. *Biological Chemistry*, 384(3). <https://doi.org/10.1515/bc.2003.052>

MOLLÁ, B.; MUÑOZ-LASSO, D. C.; RIVEIRO, F.; BOLINCHES-AMORÓS, A.; PALLARDÓ, F. V.; FERNANDEZ-VILATA, A.; DE LA IGLESIA-VAYÁ, M.; PALAU, F.; & GONZÁLEZ-CABO, P. (2017). Reversible Axonal Dystrophy by Calcium Modulation in Frataxin-Deficient Sensory Neurons of YG8R Mice. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00264>

MONNIER, V.; LLORENS, J. L. M.; & NAVARRO, J. C. (2018). Impact of *Drosophila* Models in the Study and Treatment of Friedreich's Ataxia. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7), 1989. <https://doi.org/10.3390/ijms19071989>

NAPOLI, E.; TARONI, F.; & CORTOPASSI, G. A. (2006). Frataxin, Iron-Sulfur Clusters, Heme, ROS, and Aging. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8(3-4), 506-516. <https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.506>

NAVARRO, J. C.; OHMANN, E.; SANCHEZ, D.; BOTELLA, J. R.; LIEBISCH, G.; MOLTÓ, M. C. C.; GANFORNINA, M. D.; SCHMITZ, G.; & SCHNEUWLY, S. (2010). Altered lipid metabolism in a *Drosophila* model of Friedreich's ataxia. *Human Molecular Genetics*, 19(14), 2828-2840. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq183>

NIRAULA, P.; & KIM, M. S. (2019). N-Acetylcysteine extends lifespan of *Drosophila* via modulating ROS scavenger gene expression. *Biogerontology*, 20(4), 533-543. <https://doi.org/10.1007/s10522-019-09815-4>

OFFEN, D.; GILGUN-SHERKI, Y.; BARHUM, Y.; BENHAR, M.; GRINBERG, L.; REICH, R.; MELAMED, E.; & ATLAS, D. (2004). A low molecular weight copper chelator crosses the blood-brain barrier and attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neurochemistry*, 89(5), 1241-1251. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02428.x>

PALOMO, G. M.; CERRATO, T.; GARGINI, R.; & DÍAZ-NIDO, J. (2011). Silencing of frataxin gene expression triggers p53-dependent apoptosis in human neuron-like cells. *Human Molecular Genetics*, 20(14), 2807-2822. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr187>

PARKINSON, M. H.; BOESCH, S.; NACHBAUER, W.; MARIOTTI, C.; & GIUNTI, P. (2013). Clinical features of Friedreich's ataxia: classical and atypical phenotypes. *Journal of Neurochemistry*, 126, 103-117. <https://doi.org/10.1111/jnc.12317>

PASCUAL, C. (2022). Avaluació en *Drosophila melanogaster* d'inhibidors de la mort cel·lular per ferroptosis com a possible teràpia per a l'Ataxia de Friedreich. [Trabajo fin de máster]. Universitat de València.

PUCCIO, H.; SIMON, D.; COSSÉE, M.; CRIQUI-FILIPPE, P.; TIZIANO, F. D.; MELKI, J.; HINDELANG, C.; MATYAS, R.; RUSTIN, P.; & KOENIG, M. (2001). Mouse models for Friedreich ataxia exhibit cardiomyopathy, sensory nerve defect and Fe-S enzyme deficiency followed by intramitochondrial iron deposits. *Nature Genetics*, 27(2), 181-186. <https://doi.org/10.1038/84818>

RISTOW, M.; & ZARSE, K. (2010). How increased oxidative stress promotes longevity and metabolic health: The concept of mitochondrial hormesis (mitohormesis). *Experimental Gerontology*, 45(6), 410-418. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.03.014>

RODRÍGUEZ, L.; CALAP-QUINTANA, P.; LAPEÑA-LUZÓN, T.; PALLARDÓ, F. V.; SCHNEUWLY, S.; NAVARRO, J. C.; & GONZALEZ-CABO, P. (2020). Oxidative stress modulates rearrangement of endoplasmic reticulum-mitochondria contacts and calcium dysregulation in a Friedreich's ataxia model. *Redox biology*, 37, 101762. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101762>

RODRÍGUEZ, L.; LAPEÑA, T.; CALAP-QUINTANA, P.; MOLTÓ, M. C. C.; GONZALEZ-CABO, P.; & NAVARRO, J. A. (2020). Antioxidant Therapies and Oxidative Stress in Friedreich's Ataxia: The Right Path or Just a Diversion? *Antioxidants*, 9(8), 664. <https://doi.org/10.3390/antiox9080664>

RUSSI, M. E.; MARTIN, E.; D'AUTRÉAUX, B.; TIXIER, L.; TRICOIRE, H.; & MONNIER, V. (2020). A *Drosophila* model of Friedreich ataxia with CRISPR/Cas9 insertion of GAA repeats in the frataxin gene

reveals in vivo protection by N-acetyl cysteine. *Human Molecular Genetics*.  
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddaa170>

SAKAMOTO, N.; CHASTAIN, P. D.; PARNIEWSKI, P.; OHSHIMA, K.; PANDOLFO, M.; GRIFFITH, J. D.; & WELLS, R. D. (1999). Sticky DNA. *Molecular Cell*, 3(4), 465-475. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80474-8](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80474-8)

SANCHEZ, N.; CHAPDELAINE, P.; ROUSSEAU, J.; RAYMOND, F.; CORBEIL, J.; & TREMBLAY, J. P. (2016). Characterization of frataxin gene network in Friedreich's ataxia fibroblasts using the RNA-Seq technique. *Mitochondrion*. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2016.06.003>

SANTOS, M. M.; OHSHIMA, K.; & PANDOLFO, M. (2001). Frataxin deficiency enhances apoptosis in cells differentiating into neuroectoderm. *Human Molecular Genetics*, 10(18), 1935-1944. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.18.1935>

SCHIMEL, A. M.; ABRAHAM, L. J.; COX, D.; SENE, A.; KRAUS, C. L.; DACE, D. S.; ERCAL, N.; & APTE, R. S. (2011). N-Acetylcysteine Amide (NACA) Prevents Retinal Degeneration by Up-Regulating Reduced Glutathione Production and Reversing Lipid Peroxidation. *American Journal of Pathology*, 178(5), 2032-2043. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.01.036>

SCHMUCKER, S.; ARGENTINI, M.; CARELLE-CALMELS, N.; MARTELLI, A.; & PUCCIO, H. (2008). The in vivo mitochondrial two-step maturation of human frataxin. *Human Molecular Genetics*, 17(22), 3521-3531. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn244>

SHAHRIPOUR, R. B.; HARRIGAN, M. R.; & ALEXANDROV, A. V. (2014). N-acetylcysteine (NAC) in neurological disorders: mechanisms of action and therapeutic opportunities. *Brain and behavior*, 4(2), 108-122. <https://doi.org/10.1002/brb3.208>

SHAPOSHNIKOV, M.; ZEMSKAYA, N.; KOVAL, L.; SCHEGOLEVA, E. V.; ZHAVORONKOV, A.; & MOSKALEV, A. (2018). Effects of N-acetyl-L-cysteine on lifespan, locomotor activity and stress-resistance of 3 Drosophila species with different lifespans. *Aging*, 10(9), 2428-2458. <https://doi.org/10.18632/aging.101561>

SIMON, D.; SEZNEC, H.; GANSMULLER, A.; CARELLE, N.; WEBER, P.; METZGER, D.; RUSTIN, P.; KOENIG, M.; & PUCCIO, H. (2004). Friedreich Ataxia Mouse Models with Progressive Cerebellar and Sensory Ataxia Reveal Autophagic Neurodegeneration in Dorsal Root Ganglia. *The Journal of Neuroscience*, 24(8), 1987-1995. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.4549-03.2004>

STELLER, H. (2008). Regulation of apoptosis in Drosophila. *Cell Death & Differentiation*, 15(7), 1132-1138. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.50>

SUNITHA, K. V. N.; HEMSHEKHAR, M.; THUSHARA, R.; SANTHOSH, M. S.; YARISWAMY, M.; KEMPARAJU, K.; & GIRISH, K. S. (2013). N-Acetylcysteine amide: a derivative to fulfil the promises of

N-Acetylcysteine. *Free Radical Research*, 47(5), 357-367.  
<https://doi.org/10.3109/10715762.2013.781595>

TAMARIT, J.; OBIS, È.; & ROS, J. (2016). Oxidative stress and altered lipid metabolism in Friedreich ataxia. *Free Radical Biology and Medicine*, 100, 138-146.  
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.06.007>

TARDIOLO, G.; BRAMANTI, P.; & MAZZON, E. (2018). Overview on the Effects of N-Acetylcysteine in Neurodegenerative Diseases. *Molecules*, 23(12), 3305.  
<https://doi.org/10.3390/molecules23123305>

TSOU, A.; PAULSEN, E. K.; LAGEDROST, S. J.; PERLMAN, S.; MATHEWS, K. D.; WILMOT, G.; RAVINA, B.; KOEPPEN, A. H.; & LYNCH, D. A. (2011). Mortality in Friedreich Ataxia. *Journal of the Neurological Sciences*, 307(1-2), 46-49. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2011.05.023>

TURCHI, R.; TORTOLICI, F.; GUIDOBALDI, G.; IACOVELLI, F.; FALCONI, M.; RUFINI, S.; FARAONIO, R.; CASAGRANDE, V.; FEDERICI, M.; DE ANGELIS, L.; CAROTTI, S.; FRANCESCONI, M.; ZINGARIELLO, M.; MORINI, S.; BERNARDINI, R.; MATTEI, M.; LA ROSA, P.; PIEMONTE, F.; LETTIERI-BARBATO, D.; & AQUILANO, K. (2020). Frataxin deficiency induces lipid accumulation and affects thermogenesis in brown adipose tissue. *Cell Death Dis*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2253-2>

URSINI, F.; MAIORINO, M.; BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; AUMANN, K. D.; ROVERI, A.; SCHOMBURG, D.; & FLOHÉ, L. (1995). [5] Diversity of glutathione peroxidases. En *Methods in Enzymology* (pp. 38-53). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(95\)52007-4](https://doi.org/10.1016/0076-6879(95)52007-4)

VANKAN, P. (2013). Prevalence gradients of Friedreich's Ataxia and R1b haplotype in Europe co-localize, suggesting a common Palaeolithic origin in the Franco-Cantabrian ice age refuge. *Journal of Neurochemistry*, 126, 11-20. <https://doi.org/10.1111/jnc.12215>

WU, W.; GOLDSTEIN, G. D.; ADAMS, C. D.; MATTHEWS, R. H.; & ERCAL, N. (2006). Separation and quantification of N-acetyl-l-cysteine and N-acetyl-cysteine-amide by HPLC with fluorescence detection. *Biomedical Chromatography*, 20(5), 415-422. <https://doi.org/10.1002/bmc.583>

XIE, Y.; HOU, W. S.; SONG, X. Y.; YU, Y.; HUANG, J.; SUN, X.; KANG, R.; & TANG, D. (2016). Ferroptosis: process and function. *Cell Death & Differentiation*, 23(3), 369-379. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.158>

ZHANG, S.; & NAPIERALA, M. (2019). Therapeutic Prospects for Friedreich's Ataxia. *Trends in Pharmacological Sciences*, 40(4), 229-233. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2019.02.001>

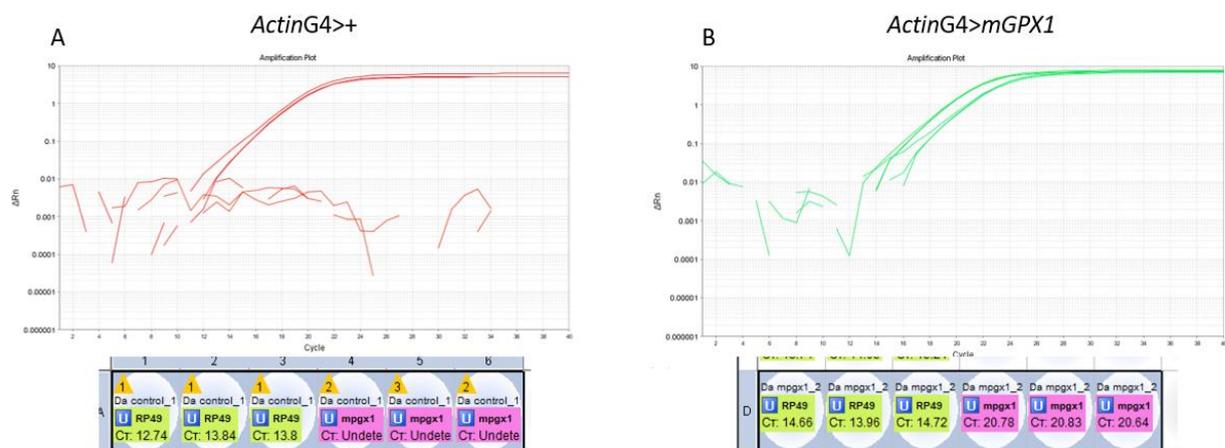
ZHOU, L. P.; SCHNITZLER, A.; AGAPITE, J.; SCHWARTZ, L. M.; STELLER, H.; & NAMBU, J. R. (1997). Cooperative functions of the *reaper* and *head involution defective* genes in the programmed cell death

of *Drosophila* central nervous system midline cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(10), 5131-5136. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.10.5131>

## 8. ANEXO

### 8.1. Análisis de la expresión del gen *mGPX1*

El experimento consistió en el estudio de la capacidad de la línea *UAS-mGPX1* para expresar el gen *mGPX1* en *Drosophila*. Para ello, se estudió su expresión en moscas *ActinG4>mGPX1*, utilizando como control negativo moscas con el genotipo *ActinG4>+*. Los resultados muestran que el gen *mGPX1* no se expresa en las moscas control, por lo que su CT es indeterminado (Figura A1A), mientras que en las moscas *ActinG4>mGPX1*, sí que se obtienen valores de CT de unos 20 ciclos (Figura A1B), por lo que la expresión ha sido un éxito.



**Figura A1. Análisis de la coexpresión de *mGPX1* en moscas sin deficiencia de frataxina. (A)** Expresión de *mGPX1* en moscas control en las que no se ha llevado a cabo la interacción genética. El valor de Ct es indeterminado debido a la ausencia de gen. **(B)** Expresión de *mGPX1* en moscas en las que sí se ha llevado a cabo la interacción genética, ya que se obtiene valor de Ct.

**Tabla A1. Secuencia de los cebadores utilizados en la PCR semicuantitativa.**

Genes	Secuencia de los cebadores (5' → 3')
<i>RP49</i>	F: CCAAGCACTTCATCCGCCACC
	R: GCGGGTGCCTTGTTCGATCC
<i>Reaper</i>	F: TGGCATTCTACATACCCGATCA
	R: CCAGGAATCTCCACTGTGACT
<i>Hid</i>	F: CACCGACCAAGTGCTATACG
	R: GCGGATACTGGAAGATTGTC
<i>Diap1</i>	F: GCGTGGAATCGGTTGCTG
	R: GATGCGATCTAATGCTTCGGC
<i>mGPX1</i>	F: AGTCCACCGTGTATGCCTTCT
	R: GAGACGCGACATTCTCAATGA

## 8.2. Relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible

Tabla A2. Objetivos de Desarrollo Sostenibles y su relación con la investigación de la AF.

Objetivos de Desarrollo Sostenibles	Alto	Medio	Bajo	No Procede
ODS 1. <b>Fin de la pobreza.</b>				X
ODS 2. <b>Hambre cero.</b>				X
ODS 3. <b>Salud y bienestar.</b>	X			
ODS 4. <b>Educación de calidad.</b>				X
ODS 5. <b>Igualdad de género.</b>				X
ODS 6. <b>Agua limpia y saneamiento.</b>				X
ODS 7. <b>Energía asequible y no contaminante.</b>				X
ODS 8. <b>Trabajo decente y crecimiento económico.</b>				X
ODS 9. <b>Industria, innovación e infraestructuras.</b>				X
ODS 10. <b>Reducción de las desigualdades.</b>				X
ODS 11. <b>Ciudades y comunidades sostenibles.</b>				X
ODS 12. <b>Producción y consumo responsables.</b>				X
ODS 13. <b>Acción por el clima.</b>				X
ODS 14. <b>Vida submarina.</b>				X
ODS 15. <b>Vida de ecosistemas terrestres.</b>				X
ODS 16. <b>Paz, justicia e instituciones sólidas.</b>				X
ODS 17. <b>Alianzas para lograr objetivos.</b>				X

Este trabajo se relaciona con el siguiente ODS de la Agenda 2030: “ODS 3. Salud y Bienestar”, que se centra en garantizar una vida saludable y promover el bienestar para todas las personas sin importar su edad, género, ubicación geográfica o situación económica. La investigación de inhibidores de ferroptosis como tratamientos terapéuticos de la ataxia de Friedreich permite ralentizar la progresión de la AF, aliviar los síntomas y mejorar la calidad de vida de los pacientes. Además puede tener un impacto directo en la reducción de la mortalidad y morbilidad asociadas a la enfermedad. Por lo tanto, aunque sea una enfermedad rara que tenga una prevalencia muy baja en la población es necesaria su investigación para obtener nuevos enfoques terapéuticos.