

**Profilazione di animali modello di Sclerosi Amiotrofica Laterale:  
sintomi precoci e variazioni di genere**



Dipartimento di Farmacia  
CDL in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche  
Università degli studi di Genova

Candidata:  
Emily Polizzi

Relatore:  
Prof. Massimo Grilli  
Correlatrici:  
Dott.ssa Carola Torazza  
Dott.ssa Martina Monaco

26 marzo 2025

## SOMMARIO

1.	INTRODUZIONE.....	4
1.1	Malattie neurodegenerative .....	4
1.2	Sclerosi laterale amiotrofica .....	4
1.3	Ruolo della patologia muscolare nella SLA.....	5
1.3.1	<i>Panoramica dei meccanismi patogenetici</i> .....	5
1.3.2	<i>Coinvolgimento del tessuto muscolare</i> .....	6
1.4	Componenti tissutali cellulari nella patologia .....	7
1.4.1	<i>Astroцитi</i> .....	7
1.4.2	<i>Microglia</i> .....	8
1.4.3	<i>Oligodendrociti</i> .....	9
1.4.5	<i>Cellule di Schwann</i> .....	9
1.4.6	<i>Muscolo</i> .....	10
2.	MODELLI DELLA PATOLOGIA .....	11
2.1	Modelli in vitro di SLA.....	11
2.2	Utilizzo di eucarioti unicellulari .....	11
2.3	<i>Caenorhabditis elegans</i> .....	11
2.4	<i>Drosophila melanogaster</i> .....	12
2.5	<i>Danio rerio</i> .....	13
2.6	Modelli murini, di ratto e di porcellino d'India.....	13
2.7	Modelli canini .....	15
2.8	Primati non umani .....	15
3.	VIDEO TRACKING ANALYSIS .....	16
3.1	Machine Learning .....	16
4.	SCOPO DELLA TESI .....	18
5.	MATERIALI E METODI.....	19
5.1	Animali.....	19
5.2	Test comportamentali.....	19
5.2.1	<i>Open Field</i> .....	19
5.2.2	<i>Rotarod</i> .....	20
5.2.3	<i>Page</i> .....	20

5.2.4 Grip .....	20
5.2.5 Beam Balance .....	21
5.3 Analisi statistica .....	21
6. RISULTATI e DISCUSSIONE .....	22
7. CONCLUSIONI e PROSPETTIVE FUTURE .....	44
8. BIBLIOGRAFIA .....	45

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 Malattie neurodegenerative

Le malattie neurodegenerative (NDs) sono disturbi progressivi caratterizzati dalla perdita di cellule nervose, con conseguente declino delle funzioni cognitive e/o motorie [1,2]. Tra le principali NDs vi sono la sclerosi laterale amiotrofica (SLA) [3,4], che causa debolezza muscolare e paralisi; la malattia di Alzheimer (AD) [5,6], caratterizzata da perdita di memoria e declino cognitivo; e la malattia di Parkinson (PD), nota per tremori e rigidità muscolare [7]. Nonostante le differenze, queste malattie condividono caratteristiche comuni, come la degenerazione neuronale [8,9] e la formazione di aggregati proteici anomali che compromettono la funzione cellulare e scatenano l'infiammazione [3,10–13]. Il tessuto muscolare gioca un ruolo cruciale nelle NDs, poiché la degenerazione dei motoneuroni porta ad una perdita di funzione muscolare [14,15]. Nella SLA, ciò causa atrofia e perdita di mobilità [4,16]; nella malattia di Alzheimer, la possibile sarcopenia (perdita di massa muscolare) aumenta il rischio di cadute [17,18]; nella malattia di Parkinson, la riduzione della dopamina compromette l'equilibrio e il movimento [19,20].

## 1.2 Sclerosi laterale amiotrofica

La SLA, conosciuta anche come malattia del motoneurone, è una malattia neurodegenerativa a rapida progressione [21] che si manifesta in età adulta e porta alla degenerazione dei motoneuroni nella corteccia motoria, nel tronco cerebrale e nel midollo spinale, causando debolezza progressiva negli arti e difficoltà nel camminare, parlare e deglutire. La perdita dei motoneuroni porta alla paralisi muscolare; tuttavia, diversi studi hanno mostrato che la degenerazione delle giunzioni neuromuscolari e dei muscoli si verifica prima della degenerazione dei motoneuroni [22,23].

La SLA causa cambiamenti significativi non solo al sistema motorio piramidale, ma anche al sistema nigrostriatale, alla neocorteccia, all'allocorteccia e al cervelletto [24].

Dal punto di vista meccanicistico, la SLA è stata collegata a stress ossidativo, misfolding delle proteine, squilibrio dell'omeostasi proteica, e disfunzione del sistema serotoninergico e dopaminergico, cambiamenti che si estendono oltre la corteccia motoria.

La SLA si manifesta principalmente in forma sporadica (90%-95%), mentre il restante 5%-10% dei casi di malattia sono ereditari o familiari (fALS). Le numerose mutazioni al gene superossido dismutasi 1 (SOD1, oltre 100 mutazioni ad oggi indentificate) sono responsabili circa del 20 % dei casi fALS, rappresentando quindi una delle principali cause genetiche di fALS [21]. La SOD1 è una delle proteine più abbondanti ed espresse ubiquitariamente nei tessuti dei mammiferi, con i livelli più elevati rilevati nel fegato e nel sistema nervoso centrale. Si tratta di un metallo-enzima omodimerico, in cui le due subunità di 16 kDa (153 amminoacidi nell'isoforma umana) sono collegate da un ponte disolfuro. Ogni subunità è formata da un nucleo a  $\beta$ -barile e sette anse ai margini, stabilizzate da un legame disolfuro intramolecolare, un sito di legame binucleare per i metalli, e una serie di legami a idrogeno. Il sito di legame per i metalli comprende uno ione rame e uno zinco, che rendono la SOD1 pienamente funzionale nella sua attività catalitica legando uno ione Zn e uno ione Cu per monomero [25]. La SOD1 catalizza la decomposizione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) prevenendo lo stress ossidativo dannoso per i neuroni.

Per studiare la progressione della SLA e investigare i possibili approcci terapeutici, uno dei modelli murini transgenici più utilizzati è quello recante la mutazione SOD1-G93A (una glicina sostituita da un'alanina in posizione 93) [21]. La mutazione SOD1-G93A è relativamente rara della SLA negli esseri umani, ma è anche la più studiata nei modelli murini transgenici di SLA, sia perché è ricorrente anche nei casi sporadici di SLA, sia per la bontà del modello murino transgenico che ben rappresenta la progressione della malattia nell'uomo [26]. I topi transgenici SOD1-G93A sovra esprimono la SOD1 umana mutante e sviluppano un esordio precoce di malattia intorno ai 80-90 giorni. Dopo tale data, i topi SOD1-G93A mostrano un rapido declino della funzione motoria ed una sopravvivenza fino a circa 120-125 giorni [21].

### **1.3 Ruolo della patologia muscolare nella SLA**

#### *1.3.1 Panoramica dei meccanismi patogenetici*

La SLA è una malattia neurodegenerativa complessa causata da molteplici meccanismi patogenetici, tra cui disfunzione proteica, disregolazione del segnale dell'RNA, omeostasi alterata del  $Ca^{2+}$ , stress ossidativo, disfunzione mitocondriale, eccitotossicità da

glutammato, neuroinfiammazione, alterazioni nel trasporto assonale e fattori genetici [27–31]. Uno dei processi chiave è la formazione di inclusioni citoplasmatiche nei motoneuroni, composte da proteine mal ripiegate come SOD1 e TDP-43, che causano stress del reticolo endoplasmatico e morte cellulare [3,32]. Lo stress ossidativo contribuisce ulteriormente alla degenerazione neuronale, poiché i motoneuroni sono vulnerabili ai danni dei radicali liberi, aggravati da mutazioni di SOD1 [33–35].

La disfunzione mitocondriale, inoltre, riduce la produzione di ATP e aumenta la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), favorendo la neurodegenerazione [36,37].

La neuroinfiammazione svolge un ruolo chiave: microglia e astrociti rilasciano citochine pro-infiammatorie che contribuiscono al danno neuronale, mentre l'infiltrazione di cellule immunitarie nel sistema nervoso centrale peggiora la risposta infiammatoria [38]

Inoltre, le alterazioni nel trasporto assonale, causate da mutazioni genetiche, compromettono la distribuzione di molecole essenziali, di proteine e di organelli, accelerando la degenerazione neuronale [39,40].

### *1.3.2 Coinvolgimento del tessuto muscolare*

L'atrofia muscolare nella SLA è causata dalla degenerazione dei motoneuroni, che compromette la loro comunicazione con le fibre muscolari, portando alla perdita di massa e forza muscolare [41]. L'atrofia muscolare nella SLA è determinata da molteplici meccanismi cellulari. Il sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) e il sistema autofagia-lisosoma (ALP) contribuiscono alla degradazione delle proteine muscolari, favorendo la perdita di massa muscolare [4]. Sebbene l'autofagia possa rappresentare un meccanismo di compensazione, la sua iperattivazione nei muscoli colpiti può accelerare l'atrofia [42,43].

L'apoptosi svolge un ruolo chiave, con uno squilibrio tra fattori pro e anti-apoptotici che porta alla morte delle cellule muscolari, aggravata da stress mitocondriale e ossidativo [41,44–47].

Inoltre, il processo di denervazione e re-innervazione inizialmente aiuta a mantenere la funzione muscolare, ma con il progredire della malattia diventa inefficace, causando un'atrofia irreversibile [16,48].

La SLA colpisce selettivamente le fibre muscolari di tipo II (a contrazione rapida), più vulnerabili alla denervazione, mentre le fibre di tipo I (a contrazione lenta) inizialmente

resistono ma subiscono atrofia nelle fasi avanzate. Questo fenomeno è legato allo stress ossidativo e alla maggiore sensibilità delle fibre rapide ai segnali apoptotici [45,49–52].

Un altro fattore chiave è la disfunzione mitocondriale, che compromette la produzione di ATP e aumenta il danno ossidativo [4,53]. L'infiammazione cronica e lo stress ossidativo aggravano ulteriormente la degenerazione muscolare, con elevati livelli di citochine pro-infiammatorie che attivano vie cataboliche e inibiscono la rigenerazione muscolare [54,55]. Le giunzioni neuromuscolari (NMJ) sono compromesse nella SLA, con alterazioni strutturali che riducono l'efficacia della trasmissione sinaptica, aggravando la debolezza muscolare [4,56,57]. La rigenerazione muscolare è ostacolata dalla disfunzione delle cellule satelliti (cellule staminali residenti), che presentano ridotta capacità proliferativa e differenziativa, limitando la riparazione del tessuto muscolare [4,45,58,59].

#### **1.4 Componenti tissutali cellulari nella patologia**

La degenerazione dei motoneuroni (MN) nella SLA dipende sia da meccanismi autonomi che non autonomi, coinvolgendo cellule di supporto come astrociti, microglia, oligodendrociti, cellule di Schwann e linfociti T.

Studi su topi transgenici con ablazione selettiva di SOD1 mutata hanno dimostrato che i MN sopravvivono più a lungo quando sono circondati da cellule sane, evidenziando l'importanza dell'ambiente cellulare nella progressione della malattia.

Tuttavia, i primi esperimenti con topi chimerici non hanno identificato con precisione i tipi di cellule coinvolti, rendendo necessaria un'analisi più approfondita [60].

##### *1.4.1 Astrociti*

Gli astrociti svolgono un ruolo essenziale nel sistema nervoso centrale (SNC), partecipando alla sintesi e al catabolismo dei neurotrasmettitori e alla regolazione della plasticità sinaptica. Fungono anche da riserva di glicogeno e influenzano l'eccitabilità neuronale [61–64]. Tuttavia, sotto l'influenza della microglia attivata, una sottopopolazione di astrociti può diventare neurotossica, contribuendo alla morte dei neuroni [65].

Nella SLA, la rimozione del gene SOD1 mutato dagli astrociti ritarda la risposta della microglia e aumenta la sopravvivenza del 15%, soprattutto nelle fasi avanzate della malattia, senza però influenzarne l'insorgenza [66].

Gli astrociti che sovra esprimono SOD1 mutato risultano selettivamente tossici per i motoneuroni in vitro, mentre altre cellule, come i fibroblasti, non esercitano lo stesso effetto [67,68]. Non è ancora chiaro se i motoneuroni più resistenti alla degenerazione nella SLA siano meno sensibili agli astrociti tossici o se presentino una minore neuro-infiammazione locale. I motoneuroni spinali S e FF, pur essendo esposti agli stessi astrociti dannosi, mostrano destini diversi, suggerendo che fattori intrinseci alla cellula siano determinanti nella loro vulnerabilità [69].

Inoltre, gli astrociti del midollo spinale ventrale si distinguono da quelli dorsali per l'espressione di specifici marcatori, tra cui Sema3a, una proteina essenziale per l'organizzazione dei circuiti motori. La sua perdita porta alla degenerazione selettiva dei motoneuroni alfa, mentre i motoneuroni gamma restano indenni [69,70].

#### *1.4.2 Microglia*

La microglia, cellula immunitaria residente nel cervello e nel midollo spinale, deriva da macrofagi primitivi del sacco vitellino e svolge un ruolo chiave nella risposta infiammatoria, nella formazione delle sinapsi e nella neurogenesi, attivandosi precocemente nella SLA [71–73]. La rimozione della proteina SOD1 mutata dalla microglia non influenza l'insorgenza della malattia, ma rallenta significativamente la sua progressione nelle fasi avanzate, aumentando la sopravvivenza media del 30% [74].

Inoltre, la microglia adulta che sovra esprime SOD1-G93A è tossica per i motoneuroni, mentre quella neonatale non lo è, suggerendo che la tossicità sia acquisita e non innata. L'attivazione della via NF- $\kappa$ B nella microglia sembra contribuire alla morte dei motoneuroni, poiché la sua inibizione rallenta la progressione della SLA nei topi SOD1-G93A, prolungando la sopravvivenza del 14% [75].

La microglia cerebrale e quella del midollo spinale non mostrano differenze rilevabili nella tossicità, probabilmente a causa della loro elevata mobilità lungo l'asse rostro-caudale.

Un altro fattore chiave è il sistema antiporto cisteina/glutammato (x<sub>C</sub>), che risulta aumentato nella SLA. La sua rimozione ha ridotto il rilascio di glutammato e di mediatori infiammatori, rallentando la progressione della malattia nei topi SOD1-G37R, sebbene anticipasse l'insorgenza dei sintomi. Questo suggerisce che x<sub>C</sub> potrebbe essere un

potenziale bersaglio terapeutico per prolungare la sopravvivenza dei pazienti nella fase sintomatica della SLA [76].

### 1.4.3 *Oligodendrociti*

Gli oligodendrociti, derivati dalle cellule precursori degli oligodendrociti (OPC), mielinizzano gli assoni nel sistema nervoso centrale (SNC) e forniscono supporto metabolico ai neuroni. Ogni oligodendrocita può mielinizzare fino a 50 assoni e trasporta nutrienti essenziali come lattato e piruvato tramite il trasportatore MCT1. La riduzione di MCT1 nei pazienti con SLA suggerisce una compromissione del supporto metabolico degli oligodendrociti, contribuendo alla neurodegenerazione [77,78].

Nella SLA, si osserva una demielinizzazione progressiva nella corteccia motoria e nel midollo spinale, causata dalla degenerazione degli oligodendrociti. Nei modelli animali di SLA familiare (fALS), gli OPC proliferano ma non riescono a maturare in oligodendrociti funzionali. La rimozione della proteina SOD1 mutante dagli oligodendrociti ha ritardato l'insorgenza della malattia e prolungato la sopravvivenza dei topi fALS, suggerendo che la disfunzione degli oligodendrociti contribuisca alla perdita dei motoneuroni nella SLA legata a SOD1 [79]. Tuttavia, resta da verificare se questo meccanismo sia valido anche per la SLA sporadica (sALS) e altre forme familiari.

### 1.4.5 *Cellule di Schwann*

Le cellule di Schwann, derivate dalle cellule della cresta neurale, sono le principali responsabili della mielinizzazione nel sistema nervoso periferico. A differenza degli oligodendrociti, ciascuna cellula di Schwann mielinizza un solo segmento di un assone, con un assone motorio lungo un metro che può richiedere fino a 10.000 cellule di Schwann. Oltre alla mielinizzazione, queste cellule svolgono un ruolo cruciale nella sopravvivenza e nella differenziazione dei motoneuroni (MN) durante lo sviluppo [80]. Nella SLA, le cellule di Schwann mostrano segni di demielinizzazione e rimielinizzazione, indicando il loro coinvolgimento nella malattia [81].

La modulazione della neuregulina-1 (Nrg1) potrebbe migliorare la rigenerazione assonale e la funzionalità dei MN, come dimostrato da studi su topi SOD1-G93A, in cui la somministrazione di Nrg1 ha migliorato la ramificazione assonale nel muscolo gastrocnemio

[82,83]. Il ruolo della proteina SOD1 mutante nelle cellule di Schwann è complesso. La sua riduzione nelle cellule di Schwann nei topi con la mutazione SOD1-G37R ha accelerato la progressione della SLA, riducendo la sopravvivenza media del 10% e abbassando i livelli di IGF-1, un fattore cruciale per la rigenerazione delle giunzioni neuromuscolari [84,85]. Tuttavia, nel modello SOD1-G85R la riduzione della SOD1 mutante nelle cellule di Schwann ha ritardato l'insorgenza della malattia e leggermente aumentato la sopravvivenza [86]. Questi risultati suggeriscono che le cellule di Schwann dipendono fortemente dall'attività dismutasica di SOD1. La loro protezione o il loro coinvolgimento nella SLA variano in base alla specifica mutazione della SOD1, influenzando la progressione della malattia in modi differenti [87].

#### *1.4.6 Muscolo*

Nella SLA, la retrazione delle terminazioni sinaptiche motorie dalle placche neuromuscolari è un evento precoce, ma il ruolo del muscolo nella malattia è ancora dibattuto. Studi sulla modulazione della proteina SOD1 mutante nel muscolo hanno dato risultati contrastanti. La riduzione di SOD1-G93A nei MN attraverso un trasporto retrogrado dal muscolo ha migliorato la funzione motoria, mentre la riduzione di SOD1 nel solo muscolo senza trasporto retrogrado non ha avuto effetti. Questo suggerisce che il muscolo potrebbe non essere un bersaglio primario della SLA o che la riduzione di SOD1 non fosse sufficiente. Ulteriori studi hanno dimostrato che la sovraespressione di SOD1-G93A nel muscolo causa atrofia e disfunzione mitocondriale, ma non è sufficiente da sola a indurre la degenerazione dei MN [88,89]. Un altro studio ha mostrato che la sovraespressione muscolo-specifica sia di SOD1 wild-type che di SOD1 mutante porta alla degenerazione dei MN, probabilmente a causa di un'espressione in altri tipi cellulari [90].

## 2. MODELLI DELLA PATOLOGIA

### 2.1 Modelli in vitro di SLA

Le linee cellulari neuronali che esprimono geni della SLA sono state fondamentali per comprendere i meccanismi cellulari e molecolari della malattia. La linea cellulare NSC-34, creata dalla fusione di neuroni del midollo spinale embrionale di topo e cellule di neuroblastoma murino [91], è stata transfettata con un vettore che esprime SOD1 umana wild type o la mutante G93A [92–96], dimostrando una forte somiglianza con i motoneuroni e risultando così un valido modello per lo studio della SLA. Un ulteriore passo in avanti è stato fatto con l'introduzione delle cellule staminali pluripotenti indotte umane (iPSC) [97], che permettono di generare cellule direttamente da pazienti con mutazioni della SLA familiari o sporadiche [98,99]. Oltre ai motoneuroni, le iPSC possono anche imitare altri tipi cellulari associati alla SLA, come gli astrociti, la microglia e gli oligodendrociti.

### 2.2 Utilizzo di eucarioti unicellulari

Nonostante i modelli unicellulari come il lievito *Saccharomyces cerevisiae* non possano replicare completamente i complessi fenotipi della SLA, la sua completa sequenza genomica e la presenza di ortologhi di molti geni umani, lo rendono utile per lo studio di diverse patologie [100–103]. Il lievito ha rivelato che il trasporto nucleo-citoplasma è collegato alla SLA-C9ORF72 [104], e che l'espressione della SOD1 umana nel lievito causa tossicità dovuta ad una perdita di stabilità proteica aumentando così il processo di senescenza [105]. L'iper-espressione di FUS nel lievito porta alla formazione di aggregati tossici e inibisce il sistema ubiquitina-proteasoma [100,106–109], mentre la rimozione di un sito di riconoscimento dell'RNA in FUS non agisce sulla produzione degli aggregati, ma riduce la tossicità indotta da FUS, evidenziando così che l'interazione tra FUS e RNA è essenziale per l'azione tossica di FUS [108].

### 2.3 *Caenorhabditis elegans*

Il nematode *Caenorhabditis elegans* è un modello sempre più utilizzato nella ricerca sulla SLA grazie al suo sistema nervoso semplice e ben studiato, che consente di analizzare

facilmente i circuiti neurali [110,111]. Circa il 30% dei geni umani ha un ortologo nel genoma di *C. elegans*, rendendolo un valido strumento per identificare i geni coinvolti nella SLA [111].

In particolare, l'espressione ubiquitaria della SOD1 mutata impedisce la naturale risposta biologica allo stress ossidativo e determina l'aggregazione delle proteine [112], mentre l'espressione della SOD1 mutata in tutto il sistema nervoso del verme provoca difetti nella locomozione e un'alterata trasmissione neuronale [113].

L'espressione pan-neuronale di TDP-43 nel nematode ha rivelato movimenti scoordinati [114,115], paralisi progressiva, neurodegenerazione GABAergica con compromissione delle sinapsi [116] e stress ossidativo [117]. L'iperfosforilazione di TDP-43 interferisce con l'omeostasi delle proteine, causando neurotossicità. Inoltre, l'ortologo del gene C9ORF72 di *C. elegans* ha mostrato che la sua perdita di funzione causa neurodegenerazione e difetti motori [118].

## **2.4 *Drosophila melanogaster***

*Drosophila melanogaster* è un modello molto utilizzato nella ricerca sulla SLA grazie alla sua rapida generazione di prole, alla possibilità di esprimere in modo controllato geni mutati e alla capacità di riprodurre alcuni sintomi della SLA, come disabilità locomotorie, inclusioni cellulari, disfunzione mitocondriale e morte precoce [119–123]. Le mosche transgeniche che esprimono mutazioni della SOD1 mostrano difetti nei motoneuroni, aggregati di proteine e stress ossidativo [124–126].

Studi sulle mosche hanno rivelato che la tossicità del FUS umano è ridotta inibendo l'esportazione nucleare, suggerendo il coinvolgimento del trasporto nucleo-citoplasmatico nella SLA [127,128]. Un recente screening di modificatori della SLA in modelli di *Drosophila* con FUS o TARDBP mutato ha identificato diversi amplificatori e soppressori della malattia, suggerendo percorsi cellulari e molecolari condivisi tra diverse forme di SLA [129].

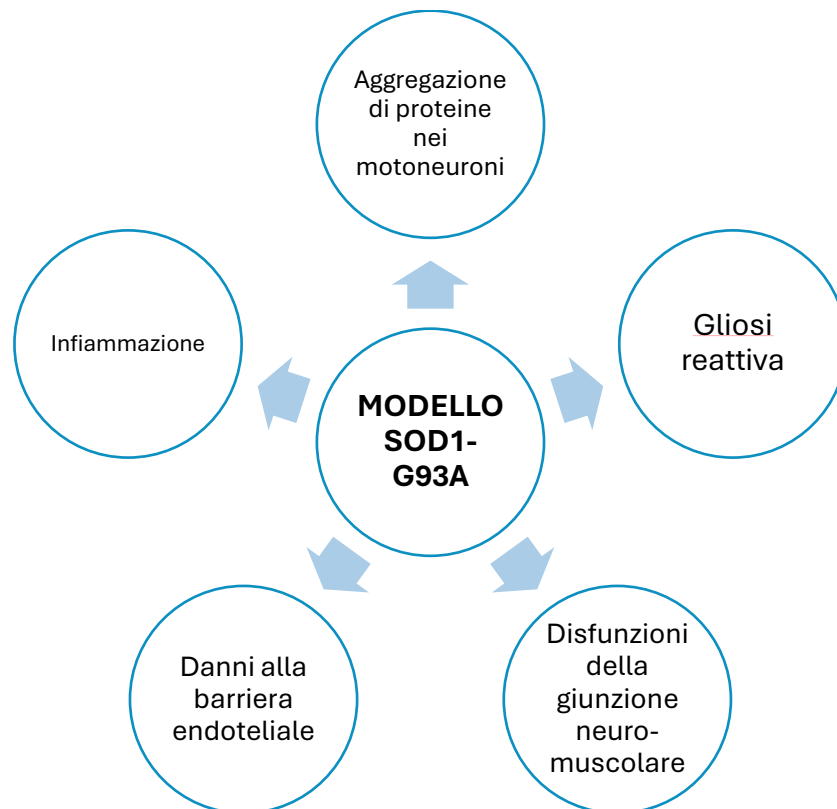
Modelli di *Drosophila* con TDP-43 hanno portato alla scoperta di potenziali approcci terapeutici, come la modulazione dell'autofagia [130–132] e della dinamica mitocondriale [133], che migliorano i difetti motori e la durata della vita.

## **2.5 *Danio rerio***

Il pesce zebra (*Danio rerio*) sta emergendo come un modello utile per la ricerca sulla SLA grazie ai suoi numerosi vantaggi, tra cui un ciclo di vita breve, alta fertilità, trasparenza larvale e somiglianze con il sistema nervoso umano. Inoltre, il genoma del pesce zebra è facilmente modificabile e presenta forti somiglianze con i geni umani coinvolti nelle malattie neurodegenerative [134–136]. Modelli transgenici di *Danio rerio* che sovra esprimono SOD1 mutato mostrano i principali sintomi della SLA, come perdita di motoneuroni, degenerazione muscolare, disfunzione delle giunzioni neuromuscolari e difficoltà motorie, con riduzione della sopravvivenza [137]. Nei pesci zebra che esprimono la forma mutata della proteina SOD1, sono stati osservati disturbi motori, misfolding delle proteine, disfunzione del trasporto ER-Golgi e mislocalizzazione di TDP-43 nel citoplasma. Tuttavia, la funzione redox della proteina isomerasi disolfuro è riuscita a recuperare questi difetti, suggerendo che la regolazione redox è cruciale per mantenere l'omeostasi cellulare [138]. La riduzione di TDP-43 nei pesci zebra ha provocato precoci difficoltà motorie e disassemblaggio delle giunzioni neuromuscolari. Inoltre, è stato identificato che una riduzione parziale di TDP-43 influenza l'espressione dell'acetilcolinesterasi, un enzima fondamentale per la connessione tra muscolo e motoneuroni [139].

## **2.6 Modelli murini, di ratto e di porcellino d'India**

Il topo (*Mus musculus*) è il modello animale più utilizzato per studiare la SLA, grazie alla sua somiglianza con gli esseri umani in termini di sviluppo e genetica [140]. Tuttavia, anche ratti (*Rattus norvegicus*) e porcellini d'India (*Cavia porcellus*), pur essendo meno comuni, sono utili in alcune ricerche grazie alle loro dimensioni più grandi e alla maggiore resistenza allo stress [141]. Il modello di topo più studiato per la SLA è il SOD1-G93A [142], che riproduce molte delle caratteristiche tipiche della malattia umana, come l'aggregazione di proteine nei motoneuroni del midollo spinale, gliosi reattiva, disfunzioni della giunzione neuromuscolare, infiammazione e danni alla barriera endoteliale [143–150].



Tuttavia, uno dei principali limiti di questo modello è che non presenta la degenerazione dei motoneuroni nella corteccia cerebrale, una caratteristica distintiva della SLA umana [151]. Altri modelli murini con mutazioni diverse nel gene SOD1, come SOD1-D83G, SOD1-D90A e SOD1-G37R, sono stati sviluppati per studiare la SLA e presentano vari fenotipi, ma condividono la capacità di mimare le principali caratteristiche patologiche della malattia [152–154].

Nei topi SOD1-G93A, che mostrano segni presintomatici di SLA, è stata osservata una riduzione progressiva della lunghezza dendritica e della densità delle spine nei neuroni piramidali della corteccia motoria, con alterazioni strutturali e funzionali legate a un'attività anomala del glutammato [155,156].

Le mutazioni del gene FUS possono essere espresse nei topi e nei ratti per simulare la SLA [157]. Nei ratti, l'espressione di FUS mutato causa disfunzioni motorie, paralisi, perdita neuronale, gliosi e aggregazione proteica nel cervello e nel midollo spinale. Nei topi, oltre all'aggregazione proteica e alla neurodegenerazione dei motoneuroni, si osservano anche problemi nel trasporto proteico tra il Golgi e il reticolo endoplasmatico, nonché danni alle giunzioni neuromuscolari [158,159].

Nei topi transgenici TDP-43, che esprimono la proteina TDP-43 mutata, sono stati osservati danni ai motoneuroni, degenerazione assonale, disfunzione mitocondriale, gliosi e perdita delle giunzioni neuromuscolari [160–162].

I porcellini d'India sono stati utilizzati in studi pionieristici per esplorare un'eziologia autoimmune della SLA. In questi studi, i porcellini d'India venivano immunizzati con motoneuroni spinali bovini purificati, inducendo difetti nei motoneuroni [163]. Successivamente, il siero di questi porcellini d'India (o di pazienti con SLA) veniva usato per infettare i topi, che mostravano un aumento del rilascio di acetilcolina, accumulo di IgG, aumento del calcio intracellulare e difetti nei motoneuroni spinali, simili alle alterazioni osservate nella SLA [164,165].

## **2.7 Modelli canini**

La mielopatia degenerativa canina (CDM) è un modello spontaneo della SLA umana correlata a SOD1, poiché presenta somiglianze cliniche e molecolari con la malattia umana [166]. La CDM è caratterizzata dalla degenerazione progressiva degli assoni, atrofia muscolare, iporiflessia, astrocitosi, demielinizzazione periferica e inclusioni di SOD1 [166–168].

Recenti studi sul ruolo della glia nella CDM hanno mostrato demielinizzazione degli oligodendrociti [168], un aumento della microglia che esprime arginasi 1 vicino ai motoneuroni [169] e l'up-regolazione dei recettori CB2 negli astrociti attivati [170]. Questi segni patologici sono simili a quelli osservati nei modelli murini di SLA e nei pazienti umani [171–173]. Data la forte somiglianza patogenetica tra la CDM e la SLA, lo studio dei tessuti canini potrebbe contribuire a comprendere meglio i meccanismi della SLA e supportare lo sviluppo di terapie.

## **2.8 Primati non umani**

I primati non umani (NHP) sono modelli ideali per studiare la SLA, grazie alle loro somiglianze anatomiche, genetiche e funzionali con gli esseri umani [174,175]. In particolare, *Callithrix jacchus* è spesso utilizzato per generare modelli di malattie neurodegenerative, come la SLA, grazie alla sua piccola taglia, facilità di gestione e rapidità nel generare forme transgeniche [176–178].

Ad esempio, sono stati creati modelli di SLA in *Callithrix jacchus* e *Macaca fascicularis* utilizzando virus adeno-associati (AAV) per somministrare microRNA specifici o shRNA mirati a geni come SOD1, FUS e TDP-43, che hanno prodotto sintomi simili alla SLA, come atrofia muscolare, debolezza motoria, mislocalizzazione di TDP-43 e aggregati di Cistatina C [93–95].

### **3. VIDEO TRACKING ANALYSIS**

La video tracking analysis è una tecnica innovativa utilizzata negli esperimenti comportamentali con i topi che consente di monitorare e analizzare in tempo reale il comportamento degli animali in un ambiente controllato. Questo approccio si basa sull'utilizzo di telecamere e software di riconoscimento per tracciare i movimenti degli animali, fornendo dati precisi su parametri come la velocità, il percorso di movimento e le interazioni sociali. Grazie a questa tecnologia, i ricercatori possono valutare l'impatto di variabili ambientali, farmacologiche o genetiche sul comportamento dei topi, facilitando la comprensione di meccanismi complessi come l'ansia, la paura e il comportamento esplorativo. Inoltre, la video tracking analysis riduce il fattore soggettivo nelle osservazioni, aumentando la riproducibilità e la validità dei risultati sperimentali. Il tracciamento video digitale ha rivoluzionato l'analisi del comportamento animale. Fino a poco tempo fa, era necessario che osservatori altamente addestrati valutassero manualmente le variabili comportamentali sia in tempo reale durante esperimenti comportamentali che da registrazioni video [182]. Pertanto, l'analisi comportamentale richiedeva un grande investimento di risorse sia per formare gli osservatori che per valutare manualmente i comportamenti. I programmi di tracciamento video digitale riducono notevolmente il carico della valutazione comportamentale perché sono facili da usare, riducendo così i requisiti di formazione, e raccolgono dati automaticamente, liberando risorse umane [183,184]

#### **3.1 Machine Learning**

I recenti avanzamenti nella potenza computazionale stanno aprendo nuove possibilità nella raccolta e nell'analisi di grandi quantità di dati sul comportamento. Oggi, molti sistemi di analisi video possono monitorare uno o più animali mentre svolgono un determinato

compito, tracciandone costantemente posizione e movimenti [185–188]. Finora, la valutazione di questi screening si è concentrata principalmente sul tracciamento, poiché analizzare i molteplici aspetti dei comportamenti complessi rimane una sfida per gli algoritmi attuali. Un'opzione sempre più promettente per affrontare questa complessità è l'apprendimento automatico, che sta trovando un'applicazione crescente sia nella ricerca sugli animali da laboratorio che su quelli selvatici [189,190]. La maggior parte dei metodi attuali si basa sull'apprendimento automatico supervisionato, che consiste in fasi di addestramento che utilizzano input etichettati manualmente per identificare modelli di dati in base alla classificazione fornita. Questo approccio è ampiamente utilizzato nella ricerca comportamentale biomedica, ad esempio nello studio dell'interazione sociale [191], del comportamento di freezing [192], dei comportamenti complessi basati sulla locomozione e sulla posizione [193,194], del comportamento di pulizia [195,196] e della comunicazione vocale [197]. L'introduzione di nuovi strumenti di programmazione sta inoltre ampliando queste applicazioni, rendendo più accessibile lo sviluppo di analisi basate su questi algoritmi [198]. Tuttavia, la qualità della classificazione dipende fortemente dal set di dati fornito, poiché questi metodi possono incorporare sistematicamente criteri soggettivi preesistenti. Ciò può essere particolarmente problematico in settori in cui l'uso di metodologie diverse porta a disaccordi sulle classificazioni comportamentali appropriate [199].

Un approccio sempre più diffuso è l'uso di algoritmi di apprendimento non supervisionato, che analizzano dati non etichettati per individuare schemi comportamentali in modo oggettivo [199–202]. Questo metodo si è rivelato particolarmente utile nel migliorare i sistemi di tracciamento tradizionali, permettendo di ricostruire con precisione le traiettorie di individui non marcati all'interno di gruppi numerosi [203,204]. Oltre a perfezionare l'identificazione degli animali, ha contribuito a mappare nuovi modelli comportamentali non rilevabili dall'osservazione umana, come dimostrato da studi su topi e mosche [200,202]. Inoltre, ha permesso di individuare caratteristiche predittive di specifiche azioni, come evidenziato da una ricerca sui moscerini della frutta, che ha scomposto i movimenti in pochi modelli chiave, utili per prevedere le traiettorie della locomozione [205]. In combinazione con l'optogenetica, questi algoritmi hanno anche aiutato a collegare l'attivazione neuronale a comportamenti specifici nelle larve di *Drosophila* [206].

Nonostante il loro potenziale, i metodi di apprendimento non supervisionato presentano alcune difficoltà di implementazione. Sebbene offrano un modo per individuare schemi

comportamentali senza predefinirli, i risultati possono variare notevolmente e il loro significato biologico dipende dall'approccio computazionale utilizzato.

È evidente, però, che l'apprendimento automatico diventerà uno strumento sempre più diffuso nella ricerca neuroscientifica. Grazie a software intuitivi e interfacce accessibili, molti laboratori possono già integrare queste tecnologie nelle loro analisi [198]. Inoltre, la possibilità di rilevare sottili variazioni comportamentali, prima inosservabili con i metodi tradizionali, aprirà nuove prospettive e dibattiti nella ricerca sul comportamento animale.

#### **4. SCOPO DELLA TESI**

Nel corso della mia tesi sperimentale ho avuto l'occasione di collaborare ad una sinergia tra il gruppo del mio relatore e quello della Dott.ssa Torazza che da anni studia il modello animale SOD1-G93A. Dai dati in letteratura emergeva chiaramente che il modello presenti ancora delle incognite quali la definizione del preciso onset patologico, i sintomi precoci e le differenze di genere. Il mio lavoro si è inserito in un contesto multidisciplinare nel quale abbiamo cercato di dare delle risposte a questi quesiti. Pertanto, abbiamo cercato di implementare i test comportamentali che routinariamente venivano applicati al modello utilizzando un test semplice, facilmente riproducibile e poco dispendioso sia in termini di tempo-uomo sia di stress per l'animale. La scelta è ricaduta sull'Open Field, test adatto a monitorare aspetti motori, esplorativi ed emotivi dell'animale. Abbiamo inoltre applicato ai video derivanti da questo test un'analisi computerizzata utilizzando un software open source al fine di rendere accessibile a chiunque la possibilità di replicare il monitoraggio dell'animale. Ne è scaturita un'analisi approfondita dell'evoluzione del modello dai 40 ai 120 giorni di vita. La mia tesi tratterà una parte di questa analisi che è stata svolta in collaborazione con altri colleghi.

## 5. MATERIALI E METODI

### 5.1 Animali

I topi adulti B6SJL-TgN SOD1/G93A(p)1Gur che esprimono un alto numero di copie del SOD1 umano mutante con una sostituzione Gly93Ala [SOD1G93A], sono stati originariamente ottenuti dai Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA). Sono stati allevati presso lo stabulario della Sezione di Farmacologia e Tossicologia del Dipartimento di Farmacia dell'Università di Genova. Gli animali transgenici sono stati incrociati con femmine wild type B6SJL corrispondenti, e la selezione riproduttiva ha mantenuto ciascun transgene nello stato emizigote. Sono stati utilizzati topi femmina e maschio, distribuiti equamente in ciascuna serie di esperimenti. È stata effettuata una tipizzazione per analizzare gli estratti tissutali delle punte delle code (omogeneizzati in soluzione salina tamponata fosfato, congelati/scongelati due volte e centrifugati a 23.000× g per 15 min a 4 °C) marcando per SOD1 dopo elettroforesi su gel di poliacrilamide (10% di risoluzione e 4% di sovrapposizione). Nei topi SOD1G93A, la morte si verifica di solito tra i 120 e i 140 giorni. Gli animali sono stati allevati a una temperatura costante ( $22 \pm 1$  °C) e umidità relativa (50%) con un regolare ciclo di luce di 12/12 h (luce alle 7 del mattino e alle 7 di sera) durante tutti gli esperimenti. Cibo e acqua erano disponibili liberamente. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in conformità con le linee guida stabilite dal Consiglio delle Comunità Europee (Direttiva 114 2010/63/EU del 22 settembre 2010) e con il D.L. italiano n. 26/2014 e sono stati approvati dal Comitato Etico locale e dal Ministero della Salute italiano (Progetto n. 214/2024-PR). Sono stati fatti tutti gli sforzi per ridurre al minimo la sofferenza degli animali e per utilizzare solo il numero di animali necessario per produrre risultati affidabili.

### 5.2 Test comportamentali

#### *5.2.1 Open Field*

L'area per l'Open field è una scatola di plexiglass di 35 cm di lunghezza x 33 cm di larghezza x 34,5 cm di altezza. Il pavimento dell'area è rivestito con una pellicola bianca.

Ogni animale è stato collocato singolarmente al centro della tavola e il comportamento è stato registrato con una videocamera per 5 minuti. Tra ogni prova animale, l'area veniva pulita con etanolo al 70%. Sono stati registrati i movimenti della testa, le variabili motorie e le variabili legate allo stress. I risultati sono riportati come medie  $\pm$  SEM. I dati comportamentali dei topi (Figura 1) sono stati analizzati utilizzando il software Tox Trac v2.98 (17/11/2022).

### *5.2.2 Rotarod*

Nel test si misura il tempo in cui un animale rimane su un cilindro rotante di un apparato rotarod accelerante (RotaRod 7650; Ugo Basile, Gemonio, VA, Italia; cod: Cat. n. 47650). In questa procedura, la rotazione dell'asta aumentava gradualmente la velocità da 4 a 40 giri/min in 5 minuti. È stato registrato il tempo in cui il topo è caduto. Gli animali sono stati addestrati per 1 settimana prima di iniziare gli esperimenti.

### *5.2.3 PAGE*

Il test paw grip endurance (PAGE), per la misura della forza degli arti posteriori, consiste nel far attaccare il topo ad una griglia che viene capovolta e sollevata ad un'altezza di circa 40 cm da terra. Sotto la griglia viene posta una gabbia vuota avente uno strato imbottito per attutire la caduta. I topi normalmente sono in grado di restare attaccati alle sbarre del coperchio di una gabbia anche se questo viene capovolto e di muoversi nell'area con facilità. Si misurava quindi il tempo di resistenza quando il topo distaccava gli arti posteriori dalla griglia o si lasciava cadere. Il test durava al massimo 2 minuti.

### *5.2.4 Grip*

I topi sono stati posizionati di fronte a una barra di presa montata su un sensore di forza per il rilevamento automatico della forza degli arti anteriori dell'animale. Il trasduttore di forza aveva una forza massima applicabile di 1500× g con una risoluzione di 0,1 g (GSM Grip-Strength Meter, Ugo Basile, Gemonio, VA, Italia; Gatto. n. 47200). Gli animali venivano sospesi per la coda, lasciati afferrare la barra di trazione collegata al dinamometro motorizzato e tirati per la coda, e veniva registrata la massima forza dell'arto anteriore

dell'avversario. Il test è stato ripetuto almeno tre volte per prova ed è stato registrato il valore medio della forza di presa del mouse (unità arbitrarie), esclusi i valori anomali.

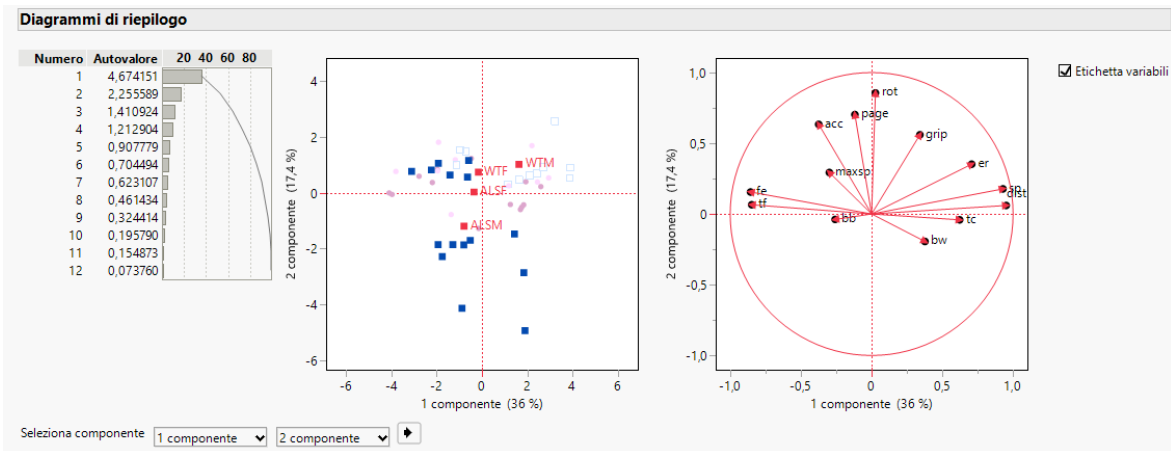
#### *5.2.5 Beam Balance*

Il test consisteva in una trave lunga 1 m con una superficie superiore larga 6 mm, che si trovava a 50 cm dal suolo. I topi sono stati posizionati al punto di partenza e incoraggiati ad attraversare il raggio per mezzo di una scatola nera posta alla fine del raggio. È stato registrato il numero di scivolamenti del piede durante la camminata lungo la trave

### **5.3 Analisi statistica**

L'analisi statistica multivariata è stata condotta con il software JMP Pro 18, mentre l'analisi univariata e la grafica boxplot con Orange 3.38. Quando nel testo viene specificato un risultato significativamente positivo si intende raggiunto un valore di  $P < 0.05$  in analisi ANOVA seguita dal test di Bonferroni.

## 6. RISULTATI e DISCUSSIONE



**Figura 1. Analisi delle componenti principali.**

Pannello 1 Autovalori e Componenti Principali: La parte sinistra mostra un grafico a barre che riporta gli autovalori delle diverse componenti principali estratte dall'analisi. Gli autovalori indicano la quantità di varianza spiegata da ciascuna componente. La prima componente ha un autovalore di 4.45553, che rappresenta una quantità significativa di varianza (34,3%), e la seconda una varianza inferiore, pari a 16%. Pannello 2 Biplot delle Componenti: Il grafico centrale rappresenta il biplot delle prime due componenti. Ogni punto nero rappresenta un'osservazione nel dataset, mentre le etichette evidenziate (in rosso) rappresentano i gruppi sperimentali. Pannello 3 Vettori delle Variabili: nella parte destra dell'immagine, troviamo i vettori delle variabili che indicano come ciascuna variabile si connette alle due componenti principali. I vettori più lunghi indicano una maggiore influenza sulla componente corrispondente.

La figura 1 rappresenta i risultati dell'analisi delle componenti principali (PCA), un metodo statistico utilizzato per ridurre la dimensionalità di un dataset, evidenziando le variabili più significative. Infatti, in questo lavoro ho combinato i dati provenienti da 5 test comportamentali diversi generando una tabella di score comportamentali composto da 13 variabili (sp = velocità media, acc = accelerazione, dist = distanza percorsa, er = esplorazione, fe = eventi di freezing, tf = tempo totale di immobilità, tc = tempo speso al centro dell'arena, bw = peso corporeo, rot = punteggio rotarod, bb = punteggio beam balance, page = punteggio al PAGE, grip = punteggio al grip e velocità massima). Le componenti 1 e 2 spiegano insieme il 50,3% della varianza.

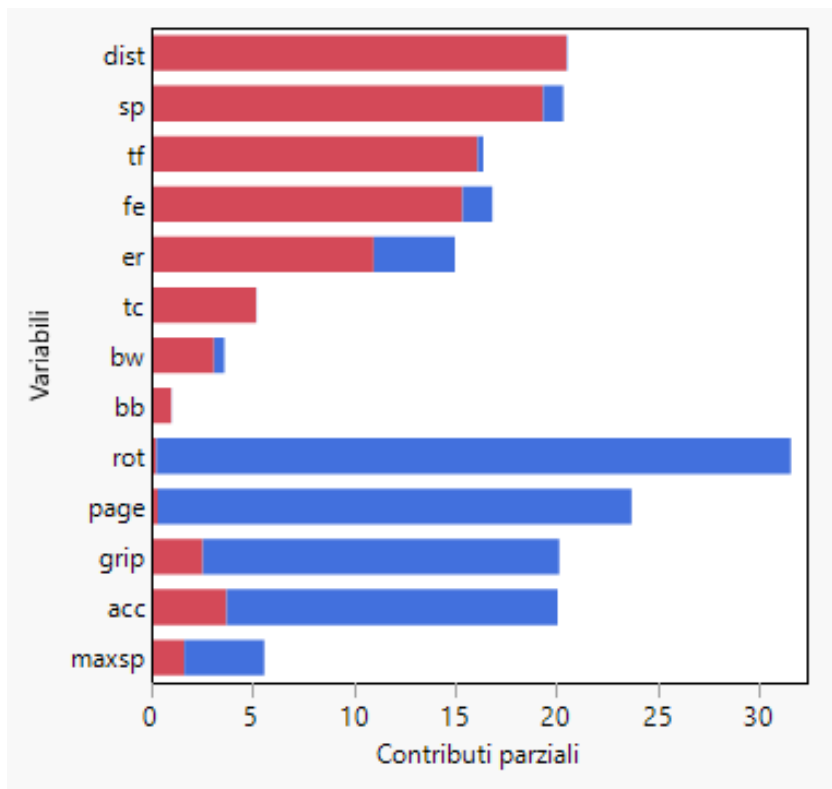


Figura 2. Grafico a barre che illustra i contributi parziali delle diverse variabili.

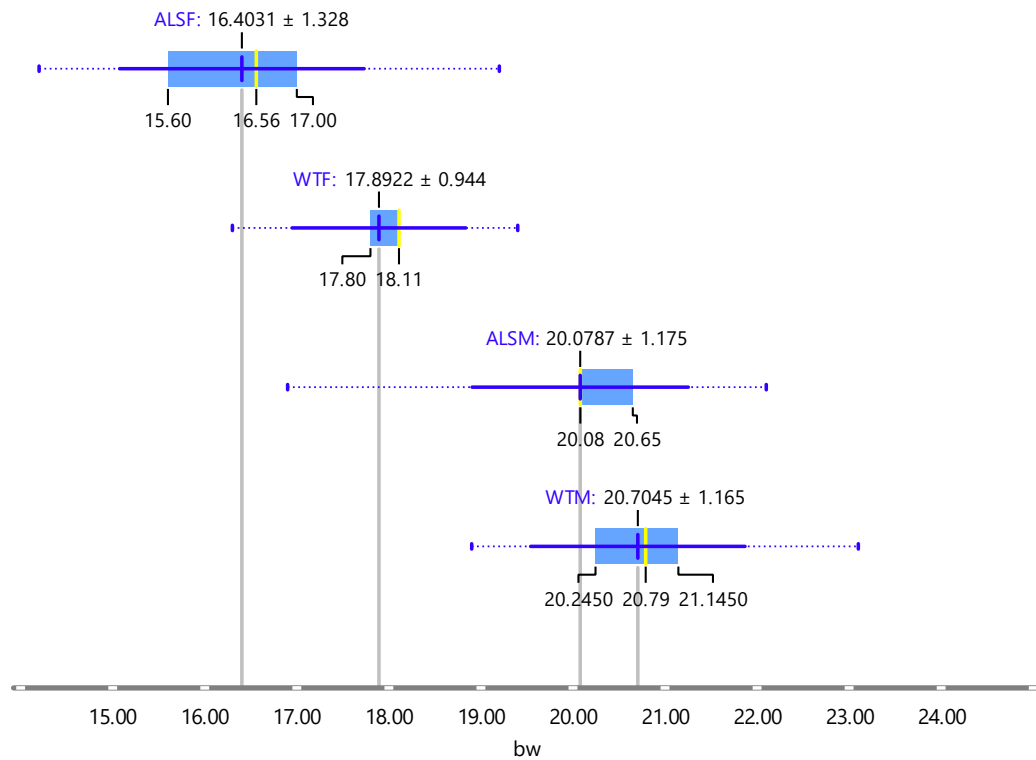
La componente 1 il cui profilo è rappresentato in rosso è caratterizzata dalle variabili provenienti dall'OF indicando come effettivamente questo test si possa sposare perfettamente con quelli storicamente applicati al modello (es GRIP e ROTAROD), ma solo se analizzato con un algoritmo di analisi computerizzata in grado di distinguere tutti i fenomeni legati al movimento dell'animale. La componente 2, i cui pesi sono mostrati in blu, è caratterizzata dai test utilizzati storicamente sul modello G93A nel nostro laboratorio (Fig.2). L'analisi della distribuzione degli animali testati (n=48) mostra come a 40 giorni gli animali portatori della malattia tendano a scivolare verso il basso rispetto ai controlli seguendo la componente 2. In particolare, i maschi G93A (ALSM ■) si staccano dai propri controlli (WTM □) trainati dai vettori delle variabili legati all'apatia (fe e tf).

Correlazioni													
	sp	acc	dist	er	fe	tf	tc	bw	rot	bb	page	grip	maxsp
sp	1,0000	-0,2100	0,9839	0,7853	-0,6700	-0,7107	0,4290	0,2117	0,1651	-0,1719	-0,0785	0,2925	-0,1142
acc	-0,2100	1,0000	-0,3695	0,0537	0,5198	0,3450	-0,1166	-0,1302	0,2447	0,1391	0,1977	0,1551	0,3461
dist	0,9839	-0,3695	1,0000	0,7217	-0,7497	-0,7533	0,4151	0,2356	0,1133	-0,1702	-0,1093	0,2473	-0,1644
er	0,7853	0,0537	0,7217	1,0000	-0,3661	-0,4985	0,2761	0,0760	0,2131	-0,1026	-0,0658	0,2321	-0,0199
fe	-0,6700	0,5198	-0,7497	-0,3661	1,0000	0,8570	-0,2265	-0,2218	-0,0586	0,1487	0,0993	-0,0982	0,2036
tf	-0,7107	0,3450	-0,7533	-0,4985	0,8570	1,0000	-0,2112	-0,3129	-0,0384	0,0387	0,1067	-0,2011	0,1491
tc	0,4290	-0,1166	0,4151	0,2761	-0,2265	-0,2112	1,0000	0,2985	-0,0983	-0,1965	-0,0148	0,1880	-0,1827
bw	0,2117	-0,1302	0,2356	0,0760	-0,2218	-0,3129	0,2985	1,0000	-0,1211	0,1122	-0,2265	0,4306	-0,1018
rot	0,1651	0,2447	0,1133	0,2131	-0,0586	-0,0384	-0,0983	-0,1211	1,0000	-0,0502	0,4968	0,4279	0,1302
bb	-0,1719	0,1391	-0,1702	-0,1026	0,1487	0,0387	-0,1965	0,1122	-0,0502	1,0000	-0,0842	-0,0363	0,2102
page	-0,0785	0,1977	-0,1093	-0,0658	0,0993	0,1067	-0,0148	-0,2265	0,4968	-0,0842	1,0000	0,3272	0,0925
grip	0,2925	0,1551	0,2473	0,2321	-0,0982	-0,2011	0,1880	0,4306	0,4279	-0,0363	0,3272	1,0000	-0,1500
maxsp	-0,1142	0,3461	-0,1644	-0,0199	0,2036	0,1491	-0,1827	-0,1018	0,1302	0,2102	0,0925	-0,1500	1,0000

Le correlazioni sono stimate per metodo A livello di riga.

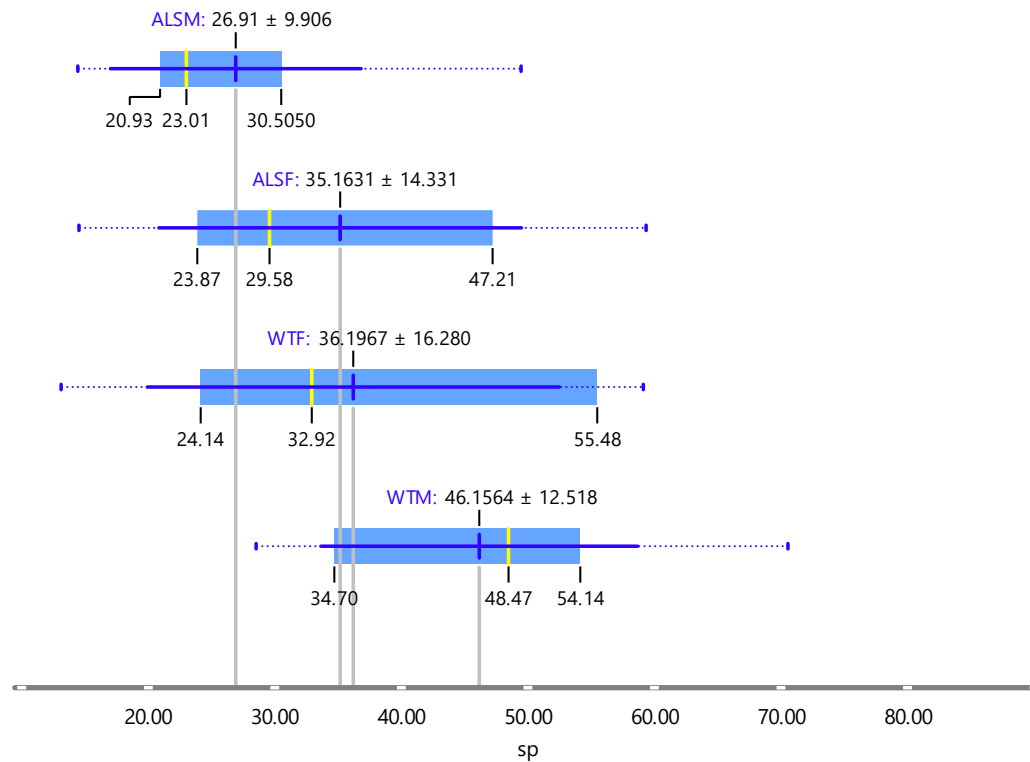
**Tabella 1. Matrice di correlazione. I valori di correlazione variano tra -1 e 1.**

Le righe e le colonne rappresentano le variabili considerate (sp, acc, dist, er, fe, tf, tc, bw, rot, bb, page, grip, maxsp). Valori vicini a 1 indicano una forte correlazione positiva (quando una variabile aumenta, anche l'altra tende ad aumentare). Valori vicini a -1 indicano una forte correlazione negativa (quando una variabile aumenta, l'altra tende a diminuire). Valori prossimi a 0 indicano che non c'è una correlazione significativa tra le variabili. L'analisi delle correlazioni mostra che la velocità media correla in maniera forte con la distanza percorsa e con l'esplorazione come potevamo aspettarci. Il tempo trascorso nella zona centrale (tc), un parametro legato all'ansia nell'animale che predilige stare lontano da questa zona quando si sente minacciato o stressato, correla positivamente con la velocità, ma non particolarmente con l'esplorazione (er). La velocità media correla negativamente con i parametri dell'apatia (fe e tf), anche questo un dato che ci attendevamo. Una correlazione debolmente negativa, ma degna di nota, è tra il peso corporeo (bw) e il tempo di immobilità (tf). Il fatto che gli animali con un peso corporeo superiore abbiano una minore apatia è in linea anche con il dato della forza muscolare nel GRIP test.



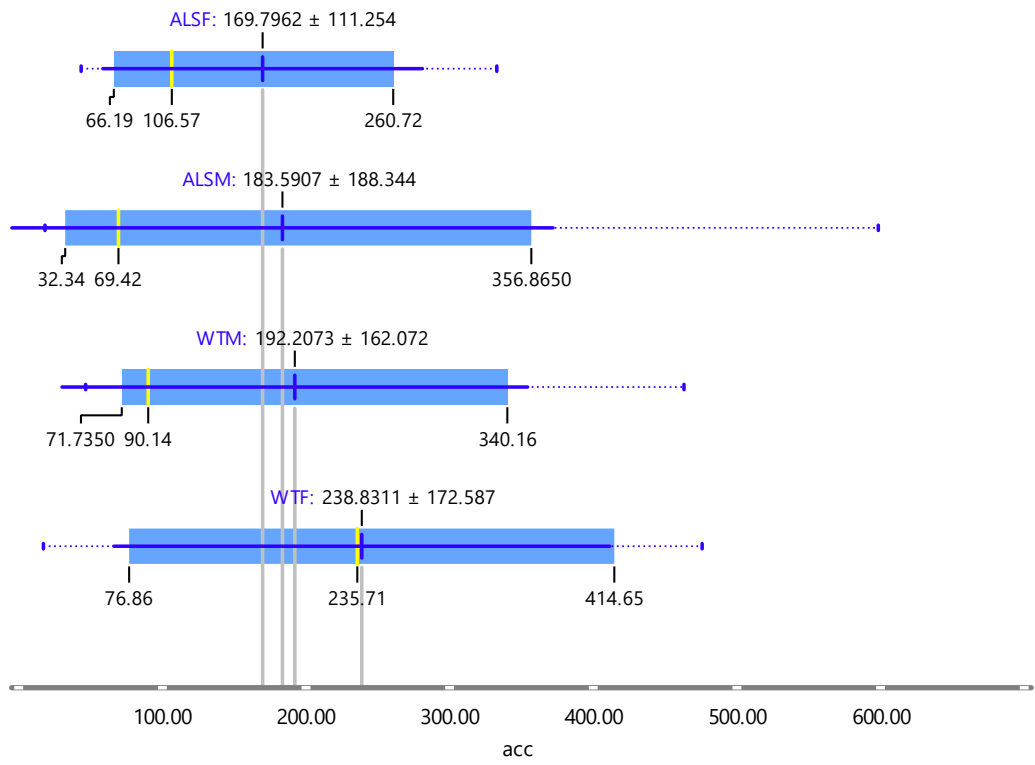
**Figura 3. Diagramma a scatola (boxplot) del peso corporeo.** Le quattro categorie analizzate sono: ALSF, WTF, ALSM e WTM. Ogni scatola rappresenta il range interquartile (IQR), ovvero l'intervallo tra il primo (Q1) e il terzo quartile (Q3), contenendo quindi il 50% centrale dei dati. La linea all'interno di ciascuna scatola rappresenta la media. Whiskers: Le linee che si estendono dalle scatole (whiskers) mostrano la variazione dei dati.

Il peso degli animali non desta particolari curiosità se non la ovvia tendenza degli animali dei gruppi malati (ALSF e ALSM) ad essere mediamente inferiori ai rispettivi controlli. La perdita di peso è un indice di sofferenza che però in questa fase non sembra ancora essere particolarmente indicativo, sostenendo le ricerche precedenti che vedevano l'onset patologico non prima dei 90 giorni [207–209].

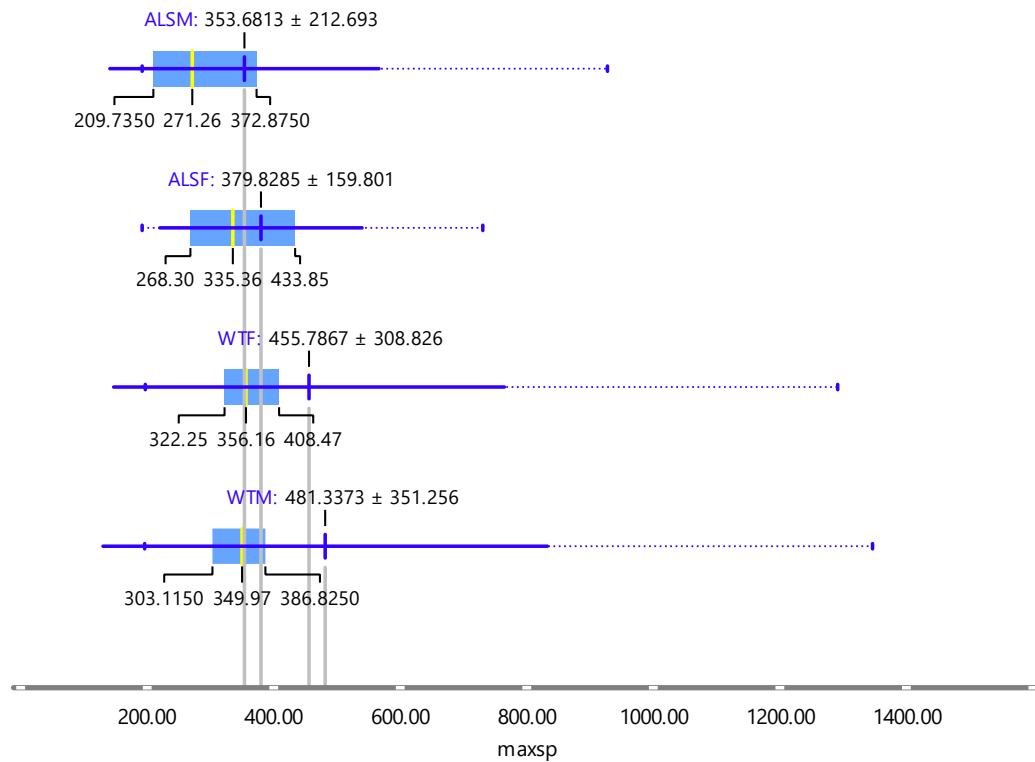


**Figura 4. Diagramma a scatola (boxplot) della velocità media.** Le quattro categorie analizzate sono: ALSF, WTF, ALSM e WTM. Ogni scatola rappresenta il range interquartile (IQR), ovvero l'intervallo tra il primo (Q1) e il terzo quartile (Q3), contenendo quindi il 50% centrale dei dati. La linea all'interno di ciascuna scatola rappresenta la media. Whiskers: Le linee che si estendono dalle scatole (whiskers) mostrano la variazione dei dati.

La velocità media a 40 giorni di età è già significativamente diversa ( $p < 0.001$ ) nei maschi malati (ALSM) rispetto ai propri controlli (WTM). Il dato è sorprendente, ma non isolato, per precocità e differenza in modo tangibile i maschi dalle femmine. Nel 2016 Preisig e colleghi hanno condotto uno degli studi più completi da un punto di vista dinamico sul modello G93A mostrando come già a 30-40 giorni si possano rilevare anomalie dell'andatura [210]. I cambiamenti precoci persistenti nel movimento e nella coordinazione degli arti possono rappresentare adattamenti funzionali compensatori a patologie come la denervazione muscolare e il numero ridotto di motoneuroni precedentemente descritte intorno a questa età [211,212].

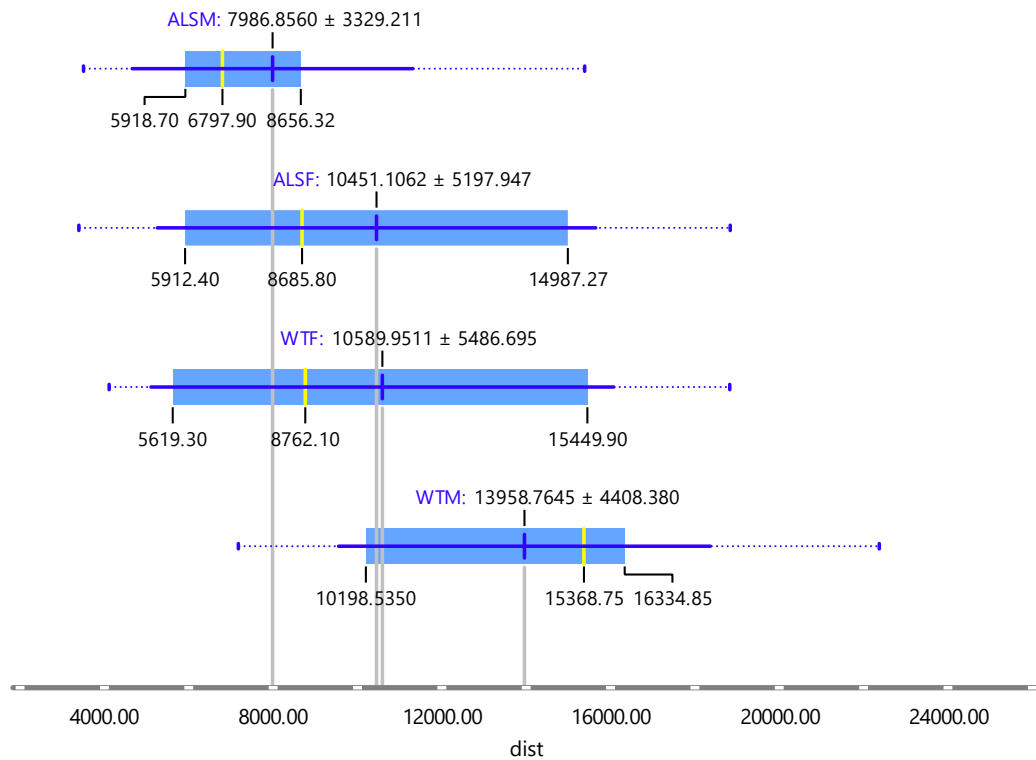


**Figura 5. Diagramma a scatola (boxplot) dell'accelerazione.** Le quattro categorie analizzate sono: ALSF, WTF, ALSM e WTM. Ogni scatola rappresenta il range interquartile (IQR), ovvero l'intervallo tra il primo (Q1) e il terzo quartile (Q3), contenendo quindi il 50% centrale dei dati. La linea all'interno di ciascuna scatola rappresenta la media. Whiskers: Le linee che si estendono dalle scatole (whiskers) mostrano la variazione dei dati.

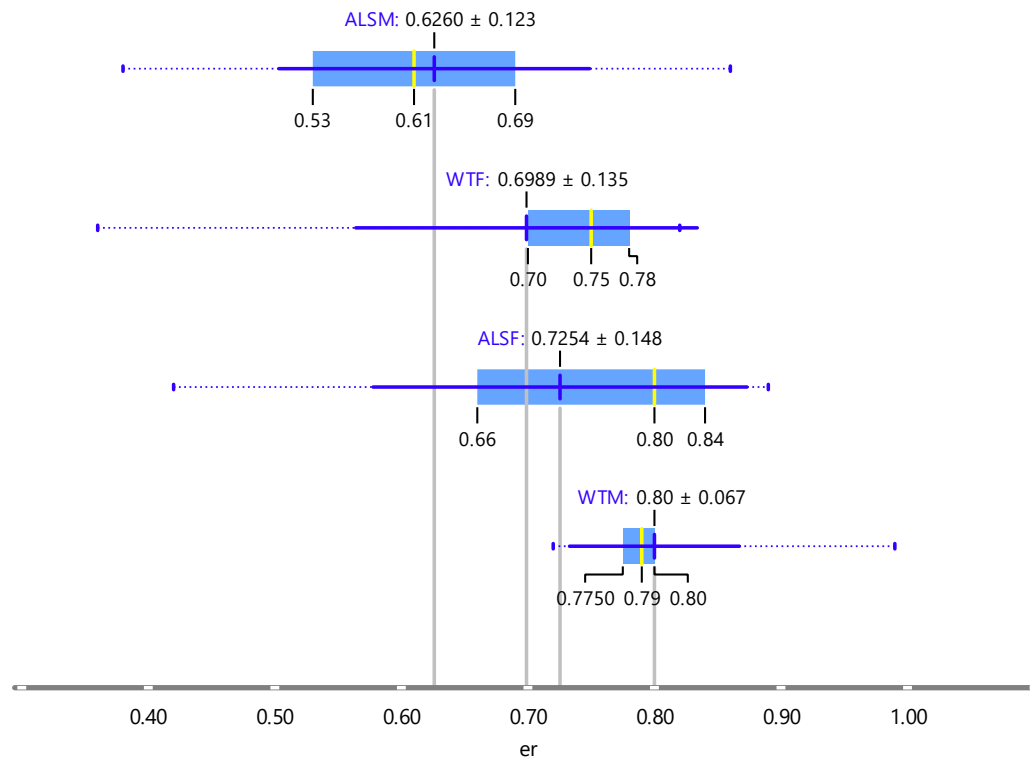


**Figura 6. Diagramma a scatola (boxplot) della velocità massima.** Le quattro categorie analizzate sono: ALSF, WTF, ALSM e WTM. Ogni scatola rappresenta il range interquartile (IQR), ovvero l'intervallo tra il primo (Q1) e il terzo quartile (Q3), contenendo quindi il 50% centrale dei dati. La linea all'interno di ciascuna scatola rappresenta la media. Whiskers: Le linee che si estendono dalle scatole (whiskers) mostrano la variazione dei dati.

Le figure 5 e 6 mostrano però che l'accelerazione e la velocità massima non sono diverse nei quattro gruppi sperimentali stabilendo che lo spunto motorio non è compromesso nei maschi malati, ma c'è una tendenza ad essere meno attivi. Anche questo dato è supportato dall'analisi di Preisig che ha dimostrato come alcuni deficit siano transitori e quindi difficilmente porteranno l'animale a non raggiungere più determinate prestazioni [210].



**Figura 7. Diagramma a scatola (boxplot) della distanza percorsa.** Le quattro categorie analizzate sono: ALSF, WTF, ALSM e WTM. Ogni scatola rappresenta il range interquartile (IQR), ovvero l'intervallo tra il primo (Q1) e il terzo quartile (Q3), contenendo quindi il 50% centrale dei dati. La linea all'interno di ciascuna scatola rappresenta la media. Whiskers: Le linee che si estendono dalle scatole (whiskers) mostrano la variazione dei dati.



**Figura 8. Diagramma a scatola (boxplot) dell'esplorazione.** Le quattro categorie analizzate sono: ALSF, WTF, ALSM e WTM. Ogni scatola rappresenta il range interquartile (IQR), ovvero l'intervallo tra il primo (Q1) e il terzo quartile (Q3), contenendo quindi il 50% centrale dei dati. La linea all'interno di ciascuna scatola rappresenta la media. Whiskers: Le linee che si estendono dalle scatole (whiskers) mostrano la variazione dei dati.

La minore propensione all'attività diventa palese quando analizziamo la distanza percorsa e l'indice di esplorazione (er) (Fig. 7 e 8). Er, inteso come numero di aree visitate rispetto al totale delle aree in cui il software ha diviso l'arena, è un dato estremamente interessante per via della capillarità che questa analisi ci consente di raggiungere. Siamo stati infatti in grado di suddividere l'arena in 306 sub aree (Immagine 1) e di evidenziare le aree di maggiore interesse con una scala colorimetrica che va dall'azzurro al rosso.

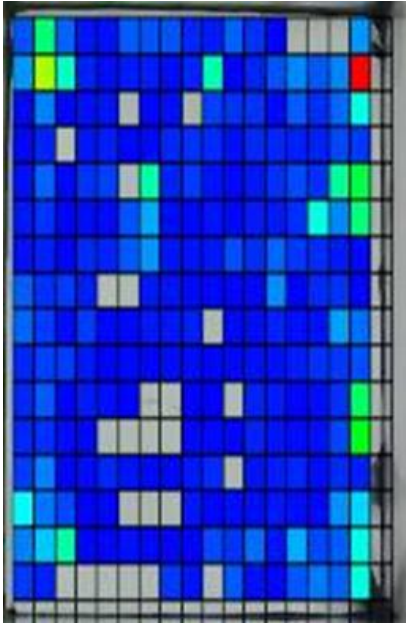


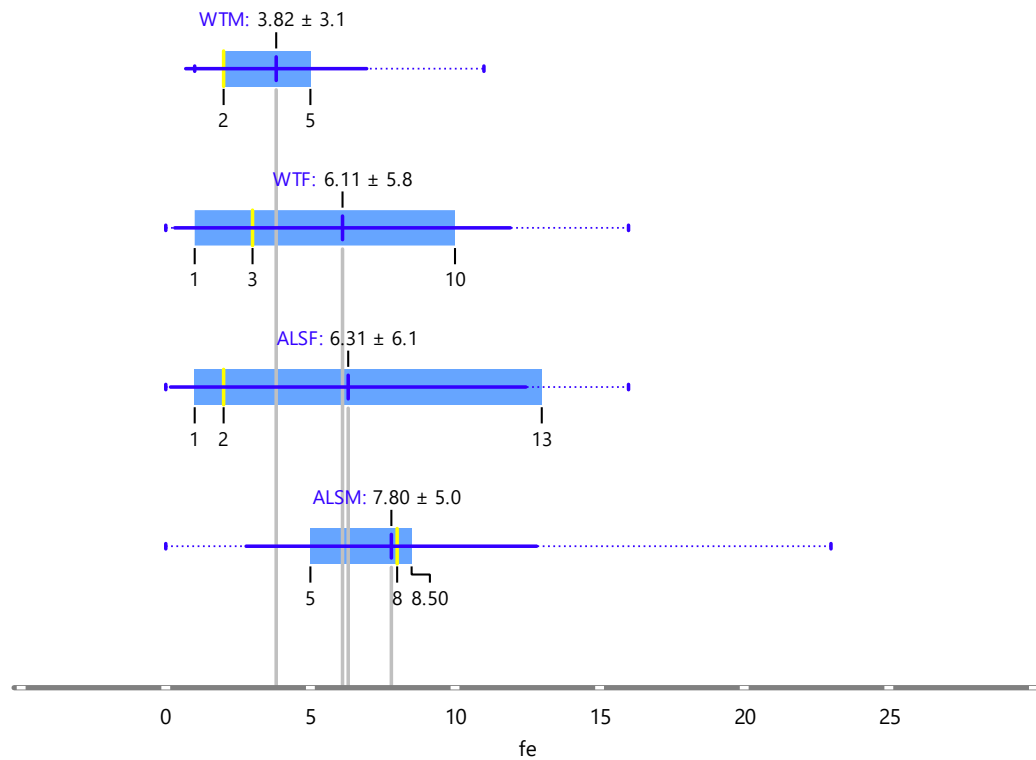
Immagine 1. Suddivisione virtuale dell'arena in area con heat map della frequenza di visita dell'animale. Immagine rappresentativa.

Frame Count	20mm	40mm	60mm	80mm	100mm	120mm	140mm	160mm	180mm	200mm	220mm	240mm	260mm	280mm	300mm	320mm	340mm	360mm	
20mm	26	124	31	6	5	29	26	26	12	8	30	15	1	0	0	0	0	47	0
40mm	48	214	99	10	4	8	9	4	11	104	1	11	26	43	28	42	321	0	
60mm	3	40	2	5	6	0	2	5	0	20	16	16	3	29	14	33	88	0	
80mm	2	11	0	7	9	2	3	12	15	13	5	13	12	10	10	22	17	0	
100mm	5	31	2	16	20	0	107	10	18	6	3	7	15	23	15	113	138	0	
120mm	7	16	1	4	4	26	54	3	2	6	2	8	8	14	89	43	122	0	
140mm	5	10	1	13	11	28	47	6	6	7	24	14	32	17	14	8	2	0	
160mm	29	15	18	9	0	0	7	6	3	3	2	2	45	1	13	16	2	0	
180mm	31	18	4	18	2	3	7	7	9	0	3	4	11	5	5	51	34	0	
200mm	12	20	18	7	1	3	1	4	4	2	3	5	5	9	15	17	25	0	
220mm	12	28	1	8	5	1	0	0	1	1	0	11	8	2	4	15	129	0	
240mm	12	15	4	2	0	0	0	0	3	3	2	11	6	4	5	22	153	0	
260mm	18	41	2	4	12	6	3	2	7	14	0	6	9	12	4	13	9	0	
280mm	80	37	22	1	2	0	0	0	7	2	4	4	7	4	2	46	68	0	
300mm	40	63	107	1	2	5	3	2	1	23	16	34	7	55	22	29	88	0	
320mm	17	10	0	0	0	0	0	17	6	0	28	5	2	27	38	30	91	0	
340mm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

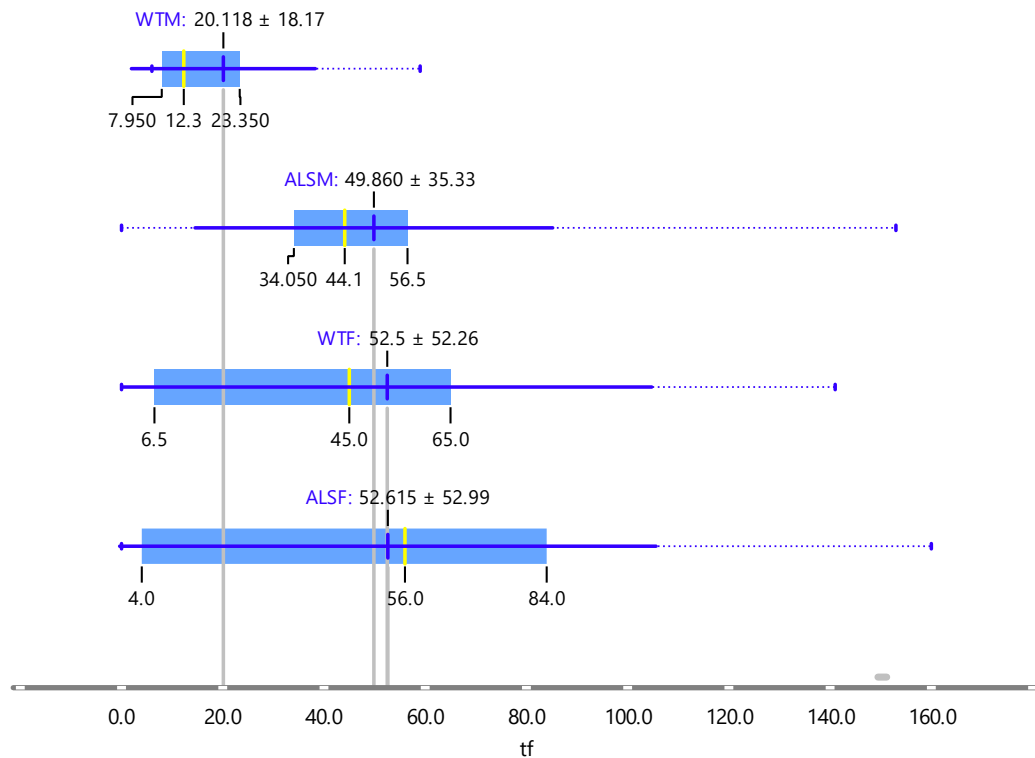
Time Count (m:s)	20mm	40mm	60mm	80mm	100mm	120mm	140mm	160mm	180mm	200mm	220mm	240mm	260mm	280mm	300mm	320mm	340mm	360mm
20mm	0:01,4	0:06,9	0:01,7	0:00,3	0:00,3	0:01,6	0:01,4	0:01,4	0:00,7	0:00,4	0:01,7	0:00,8	0:00,1	0:00,0	0:00,0	0:00,0	0:02,6	0:00,0
40mm	0:02,7	0:11,9	0:05,5	0:00,6	0:00,2	0:00,4	0:00,5	0:00,2	0:00,6	0:05,8	0:00,1	0:00,6	0:01,4	0:02,4	0:01,6	0:02,3	0:17,8	0:00,0
60mm	0:00,2	0:02,2	0:00,1	0:00,3	0:00,3	0:00,0	0:00,1	0:00,3	0:00,0	0:01,1	0:00,9	0:00,9	0:00,2	0:01,6	0:00,8	0:01,8	0:04,9	0:00,0
80mm	0:00,1	0:00,6	0:00,0	0:00,4	0:00,5	0:00,1	0:00,2	0:00,7	0:00,8	0:00,7	0:00,3	0:00,7	0:00,7	0:00,6	0:00,6	0:01,2	0:00,9	0:00,0
100mm	0:00,3	0:01,7	0:00,1	0:00,9	0:01,1	0:00,0	0:05,9	0:00,6	0:01,0	0:00,3	0:00,2	0:00,4	0:00,8	0:01,3	0:00,8	0:06,3	0:07,7	0:00,0
120mm	0:00,4	0:00,9	0:00,1	0:00,2	0:00,2	0:01,4	0:03,0	0:00,2	0:00,1	0:00,3	0:00,1	0:00,4	0:00,4	0:00,8	0:04,9	0:02,4	0:06,8	0:00,0
140mm	0:00,3	0:00,6	0:00,1	0:00,7	0:00,6	0:01,6	0:02,6	0:00,3	0:00,3	0:00,4	0:01,3	0:00,8	0:01,8	0:00,9	0:00,8	0:00,4	0:00,1	0:00,0
160mm	0:01,6	0:00,8	0:01,0	0:00,5	0:00,0	0:00,0	0:00,4	0:00,3	0:00,2	0:00,2	0:00,1	0:00,1	0:02,5	0:00,1	0:00,7	0:00,9	0:00,1	0:00,0

180mm	0:01,7	0:01,0	0:00,2	0:01,0	0:00,1	0:00,2	0:00,4	0:00,4	0:00,5	0:00,0	0:00,2	0:00,2	0:00,6	0:00,3	0:00,3	0:02,8	0:01,9	0:00,0
200mm	0:00,7	0:01,1	0:01,0	0:00,4	0:00,1	0:00,2	0:00,1	0:00,2	0:00,2	0:00,1	0:00,2	0:00,3	0:00,3	0:00,5	0:00,8	0:00,9	0:01,4	0:00,0
220mm	0:00,7	0:01,6	0:00,1	0:00,4	0:00,3	0:00,1	0:00,0	0:00,0	0:00,1	0:00,1	0:00,0	0:00,6	0:00,4	0:00,1	0:00,2	0:00,8	0:07,2	0:00,0
240mm	0:00,7	0:00,8	0:00,2	0:00,1	0:00,0	0:00,0	0:00,0	0:00,0	0:00,2	0:00,2	0:00,1	0:00,6	0:00,3	0:00,2	0:00,3	0:01,2	0:08,5	0:00,0
260mm	0:01,0	0:02,3	0:00,1	0:00,2	0:00,7	0:00,3	0:00,2	0:00,1	0:00,4	0:00,8	0:00,0	0:00,3	0:00,5	0:00,7	0:00,2	0:00,7	0:00,5	0:00,0
280mm	0:04,4	0:02,1	0:01,2	0:00,1	0:00,1	0:00,0	0:00,0	0:00,0	0:00,4	0:00,1	0:00,2	0:00,2	0:00,4	0:00,2	0:00,1	0:02,6	0:03,8	0:00,0
300mm	0:02,2	0:03,5	0:05,9	0:00,1	0:00,1	0:00,3	0:00,2	0:00,1	0:00,1	0:01,3	0:00,9	0:01,9	0:00,4	0:03,1	0:01,2	0:01,6	0:04,9	0:00,0
320mm	0:00,9	0:00,6	0:00,0	0:00,0	0:00,0	0:00,0	0:00,0	0:00,9	0:00,3	0:00,0	0:01,6	0:00,3	0:00,1	0:01,5	0:02,1	0:01,7	0:05,1	0:00,0
340mm	0:00,0	0:00,0	0:00,0	0:00,0	0:00,0	0:00,0	0:00,0	0:00,0	0:00,0	0:00,0	0:00,0	0:00,0	0:00,0	0:00,0	0:00,0	0:00,0	0:00,0	0:00,0

Frequency (%)	20mm	40mm	60mm	80mm	100mm	120mm	140mm	160mm	180mm	200mm	220mm	240mm	260mm	280mm	300mm	320mm	340mm	360mm
20mm	0,50%	2,38%	0,59%	0,12%	0,10%	0,56%	0,50%	0,50%	0,23%	0,15%	0,58%	0,29%	0,02%	0,00%	0,00%	0,00%	0,90%	0,00%
40mm	0,92%	4,10%	1,90%	0,19%	0,08%	0,15%	0,17%	0,08%	0,21%	1,99%	0,02%	0,21%	0,50%	0,82%	0,54%	0,81%	6,15%	0,00%
60mm	0,06%	0,77%	0,04%	0,10%	0,12%	0,00%	0,04%	0,10%	0,00%	0,38%	0,31%	0,31%	0,06%	0,56%	0,27%	0,63%	1,69%	0,00%
80mm	0,04%	0,21%	0,00%	0,13%	0,17%	0,04%	0,06%	0,23%	0,29%	0,25%	0,10%	0,25%	0,23%	0,19%	0,19%	0,42%	0,33%	0,00%
100mm	0,10%	0,59%	0,04%	0,31%	0,38%	0,00%	2,05%	0,19%	0,35%	0,12%	0,06%	0,13%	0,29%	0,44%	0,29%	2,17%	2,65%	0,00%
120mm	0,13%	0,31%	0,02%	0,08%	0,08%	0,50%	1,04%	0,06%	0,04%	0,12%	0,04%	0,15%	0,15%	0,27%	1,71%	0,82%	2,34%	0,00%
140mm	0,10%	0,19%	0,02%	0,25%	0,21%	0,54%	0,90%	0,12%	0,12%	0,13%	0,46%	0,27%	0,61%	0,33%	0,27%	0,15%	0,04%	0,00%
160mm	0,56%	0,29%	0,35%	0,17%	0,00%	0,00%	0,13%	0,12%	0,06%	0,06%	0,04%	0,04%	0,86%	0,02%	0,25%	0,31%	0,04%	0,00%
180mm	0,59%	0,35%	0,08%	0,35%	0,04%	0,06%	0,13%	0,13%	0,17%	0,00%	0,06%	0,08%	0,21%	0,10%	0,10%	0,98%	0,65%	0,00%
200mm	0,23%	0,38%	0,35%	0,13%	0,02%	0,06%	0,02%	0,08%	0,08%	0,04%	0,06%	0,10%	0,10%	0,17%	0,29%	0,33%	0,48%	0,00%
220mm	0,23%	0,54%	0,02%	0,15%	0,10%	0,02%	0,00%	0,00%	0,02%	0,02%	0,00%	0,21%	0,15%	0,04%	0,08%	0,29%	2,47%	0,00%
240mm	0,23%	0,29%	0,08%	0,04%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,06%	0,06%	0,04%	0,21%	0,12%	0,08%	0,10%	0,42%	2,93%	0,00%
260mm	0,35%	0,79%	0,04%	0,08%	0,23%	0,12%	0,06%	0,04%	0,13%	0,27%	0,00%	0,12%	0,17%	0,23%	0,08%	0,25%	0,17%	0,00%
280mm	1,53%	0,71%	0,42%	0,02%	0,04%	0,00%	0,00%	0,00%	0,13%	0,04%	0,08%	0,08%	0,13%	0,08%	0,04%	0,88%	1,30%	0,00%
300mm	0,77%	1,21%	2,05%	0,02%	0,04%	0,10%	0,06%	0,04%	0,02%	0,44%	0,31%	0,65%	0,13%	1,05%	0,42%	0,56%	1,69%	0,00%
320mm	0,33%	0,19%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,33%	0,12%	0,00%	0,54%	0,10%	0,04%	0,52%	0,73%	0,58%	1,74%	0,00%
340mm	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%



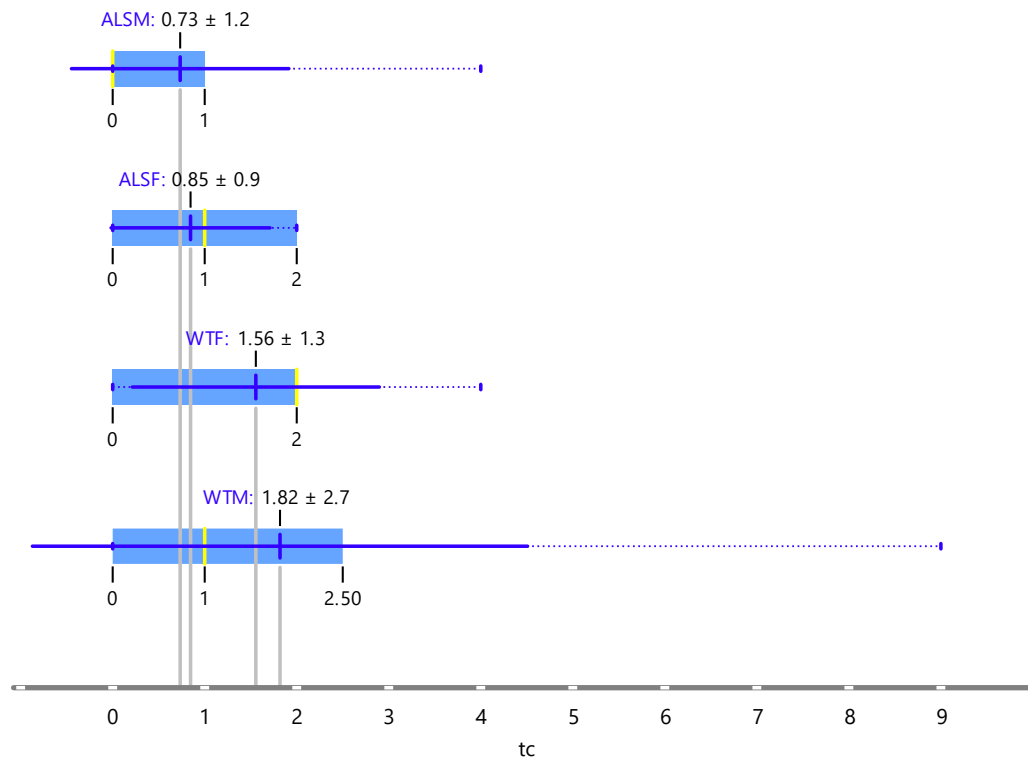
**Figura 9. Diagramma a scatola (boxplot) dei momenti di immobilità.** Le quattro categorie analizzate sono: ALSF, WTF, ALSM e WTM. Ogni scatola rappresenta il range interquartile (IQR), ovvero l'intervallo tra il primo (Q1) e il terzo quartile (Q3), contenendo quindi il 50% centrale dei dati. La linea all'interno di ciascuna scatola rappresenta la media. Whiskers: Le linee che si estendono dalle scatole (whiskers) mostrano la variazione dei dati.



**Figura 10. Diagramma a scatola (boxplot) del tempo di immobilità.** Le quattro categorie analizzate sono: ALSF, WTF, ALSM e WTM. Ogni scatola rappresenta il range interquartile (IQR), ovvero l'intervallo tra il primo (Q1) e il terzo quartile (Q3), contenendo quindi il 50% centrale dei dati. La linea all'interno di ciascuna scatola rappresenta la media. Whiskers: Le linee che si estendono dalle scatole (whiskers) mostrano la variazione dei dati.

La minore propensione al movimento è confermata significativamente ( $p < 0.05$ ) dai parametri  $f_e$  e  $t_f$  (Fig. 9 e 10). Questi parametri sono la descrizione di quante volte l'animale si blocca nell'arena ( $f_e$ ) e per quanto tempo resta fermo ( $t_f$ ). Entrambi sono una misura universalmente riconosciuta di apatia e/o stress nel roditore. Da queste variabili emerge che i maschi malati sono significativamente diversi dai propri controlli sani. Combinando questo dato con quello della figura 11 in cui vediamo il tempo trascorso nella zona meno confortevole per gli animali o zona centrale, possiamo sostenere che effettivamente il grado di stress aumenti nei maschi malati già in una fase in cui l'animale ad un esame visivo è del tutto equivalente ai controlli. Il dato correla splendidamente con i report sui pazienti umani affetti da SLA in cui è stata riportata depressione precoce, apatia e ansia [213–216].

La nostra analisi è stata quindi in grado di evidenziare in una fase estremamente precoce una sintomatologia sottostante che potrebbe essere la chiave per definire nuove strategie terapeutiche e individuare target farmacologici specifici.



**Figura 11. Diagramma a scatola (boxplot) del tempo al centro.** Le quattro categorie analizzate sono: ALSF, WTF, ALSM e WTM. Ogni scatola rappresenta il range interquartile (IQR), ovvero l'intervallo tra il primo (Q1) e il terzo quartile (Q3), contenendo quindi il 50% centrale dei dati. La linea all'interno di ciascuna scatola rappresenta la media. Whiskers: Le linee che si estendono dalle scatole (whiskers) mostrano la variazione dei dati.

Nel dettaglio possiamo comparare più finemente il comportamento degli animali maschi di controllo (WTM) con quelli malati (ALSM) nella zona centrale attraverso un algoritmo di tracciamento su base MATLAB chiamato Optimouse che è in grado di tracciare lo scheletro dell'animale sulla base di 4 punti focali. Il naso e il baricentro sono due punti chiave (Immagine 2). Il naso può identificare l'attenzione dell'animale (aspetti motori volontari attivi) e quindi mostra più nello specifico l'attività che l'animale decide di intraprendere. Il software descrive l'animale frame per frame stabilendo in ogni istante la posizione dei punti di interesse. È inoltre possibile una revisione manuale del riconoscimento che consente al ricercatore di correggere eventuali distorsioni legati alla qualità del video.

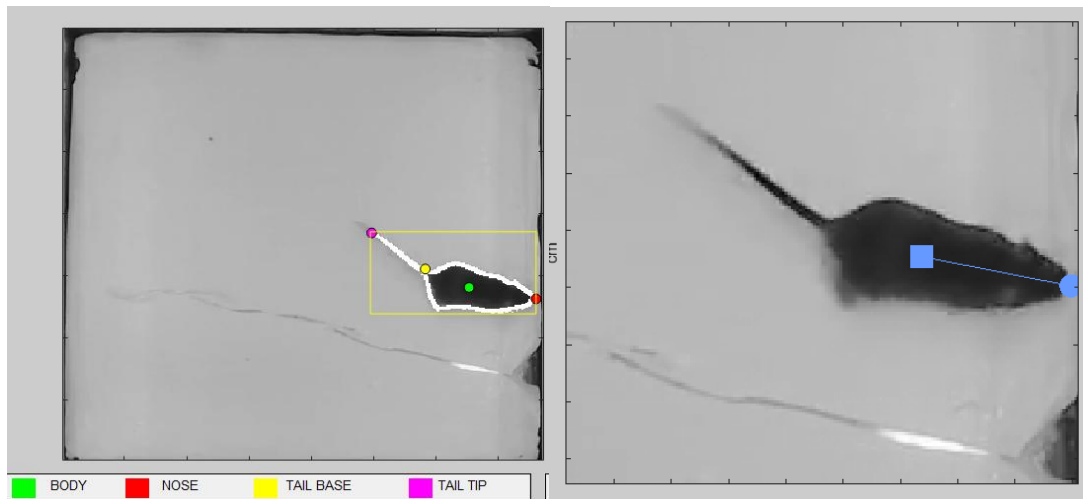


Immagine 2. Esempio di riconoscimento dell'animale da parte di Optimouse

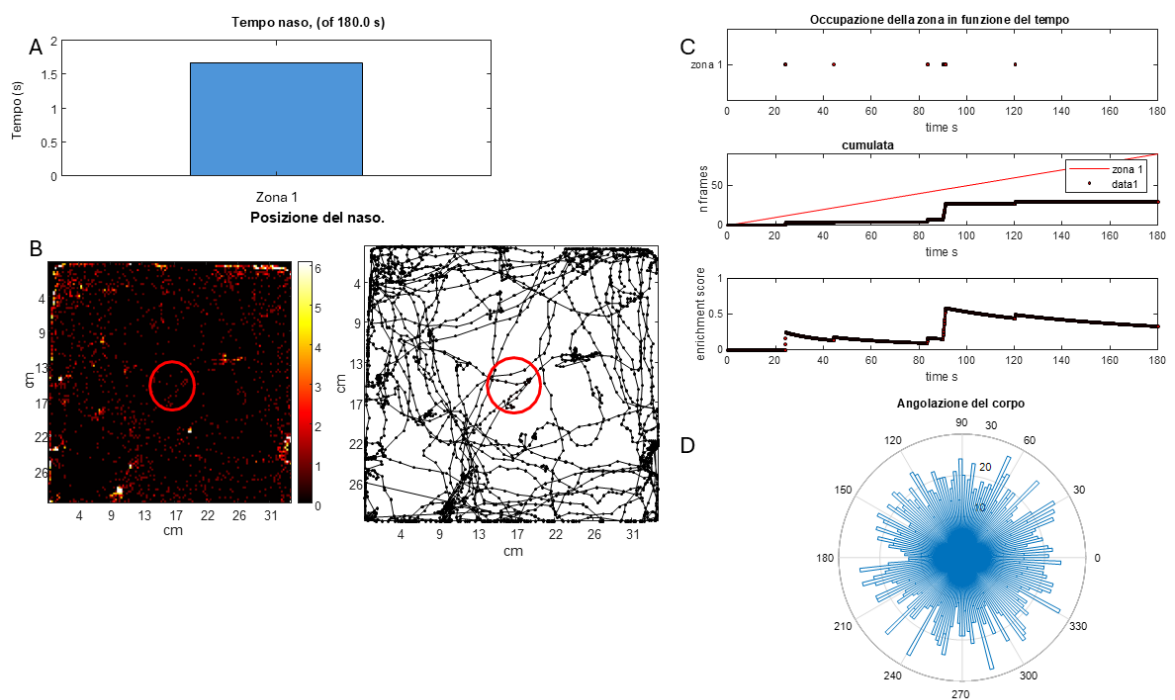
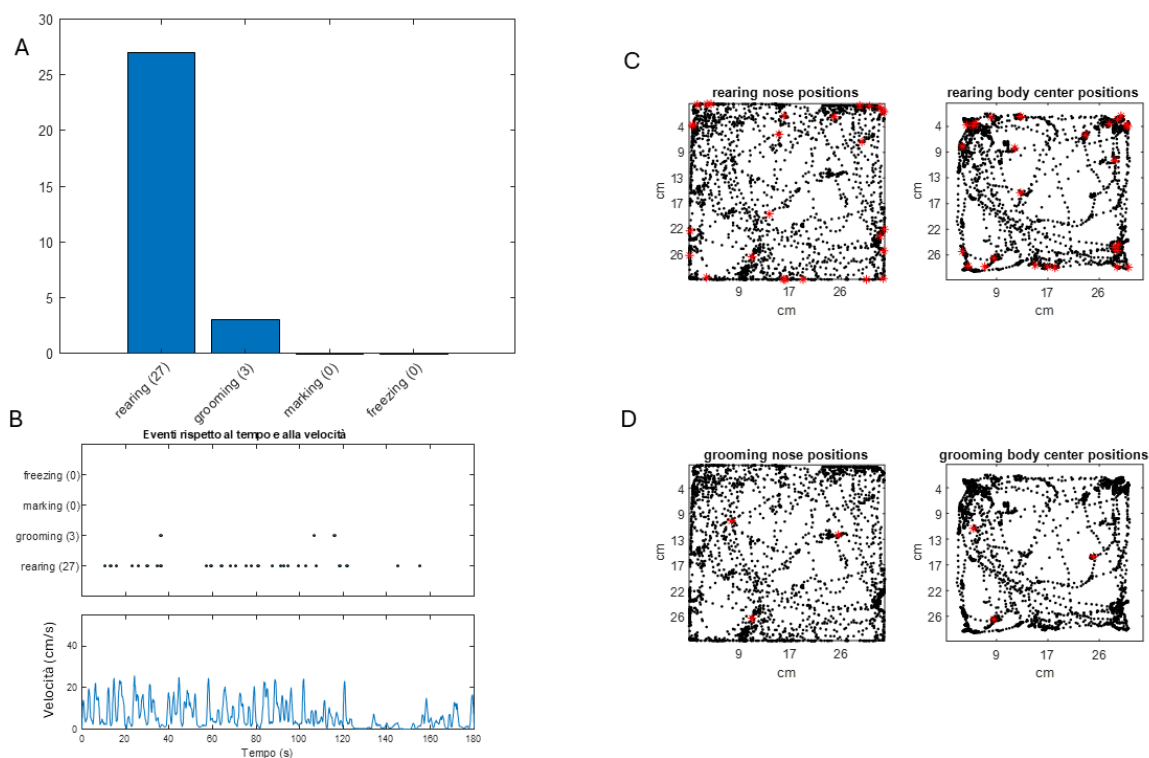


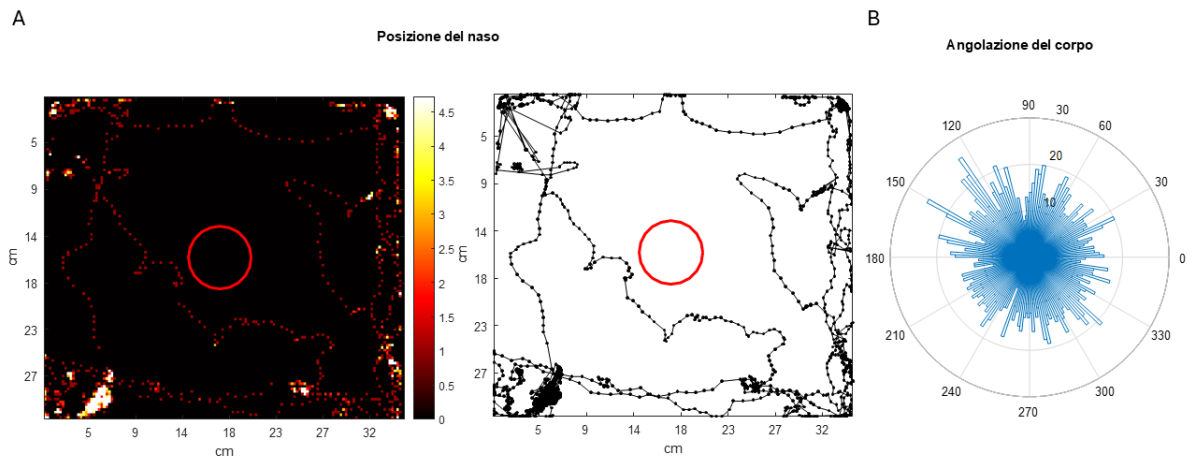
Figura 12. Tracciamento del naso dell'animale WTM quale indicatore dell'attenzione e curiosità. Pannello A: grafico a barre del tempo trascorso nella zona centrale. Pannello B: heat map della localizzazione del naso e traiettorie del naso nel tempo. Pannello C: distribuzione nel tempo dei passaggi nel naso nella zona centrale. Pannello D: cambiamenti di orientamento dell'animale nel tempo.

La figura 12 ci mostra come l'animale di controllo nei 3 minuti centrali del video attraverso con il naso alcune volte la parte centrale (Zona 1) spingendo la sua esplorazione in quasi tutte le aree dell'arena con una predilezione per gli angoli superiori. L'animale è orientato e cambia angolazioni del corpo con grande disinvoltura.



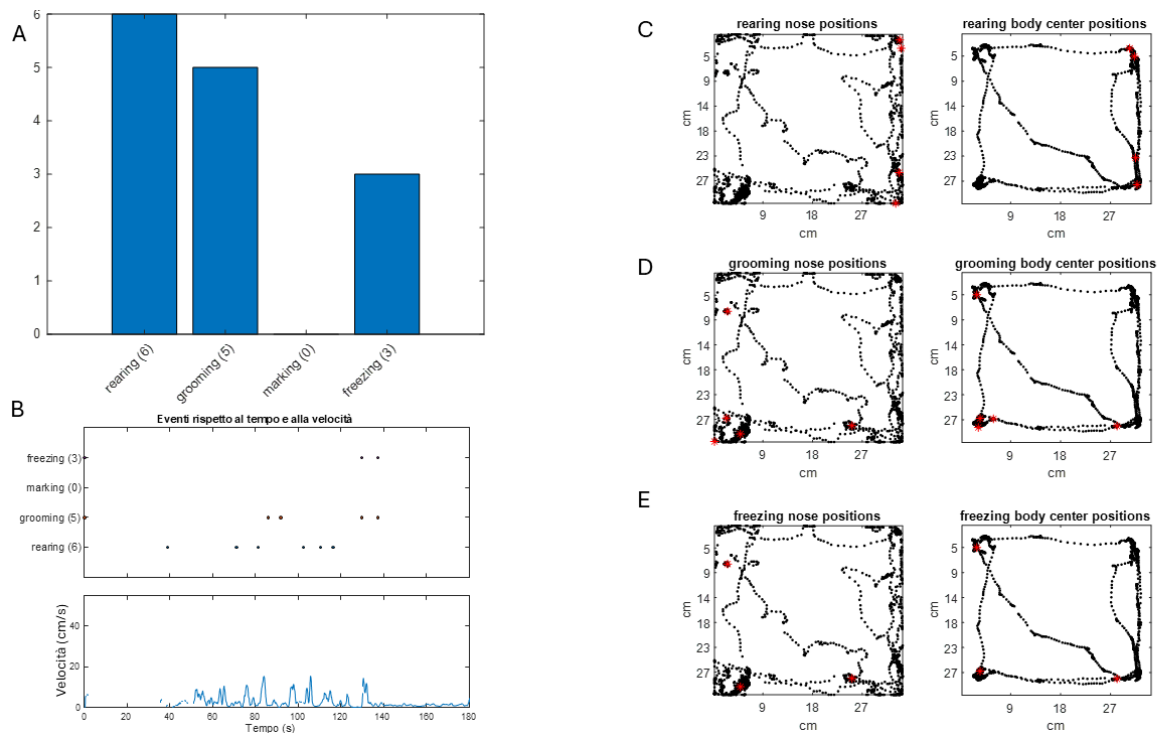
**Figura 13. Eventi comportamentali nel corso dei 180 secondi centrali dei test.** Pannello A: numero di eventi per tipologia. Pannello B: distribuzione temporale e in relazione alla velocità degli eventi. Pannello C: localizzazione negli eventi di rearing del naso e del corpo. Pannello D: localizzazione negli eventi di grooming del naso e del corpo. Analisi rappresentativa.

La figura 13 ci mostra come nel contesto dell'arena completa l'animale di controllo esegua nei 3 minuti un numero notevole di rearing (sollevamento sugli arti posteriori) a testimonianza della curiosità all'esplorare l'ambiente [217–219]. La localizzazione (punti rossi Pannello C) è prettamente periferica con alcuni episodi più centrali. Interessante notare che il grooming indice di stress è invece molto limitato e avviene spesso in un contesto semiperiferico [220–222].



**Figura 14. Tracciamento del naso dell'animale di ALSM quale indicatore dell'attenzione e curiosità.** Pannello A: heat map della localizzazione del naso e traiettorie del naso nel tempo. Pannello B: cambiamenti di orientamento dell'animale nel tempo.

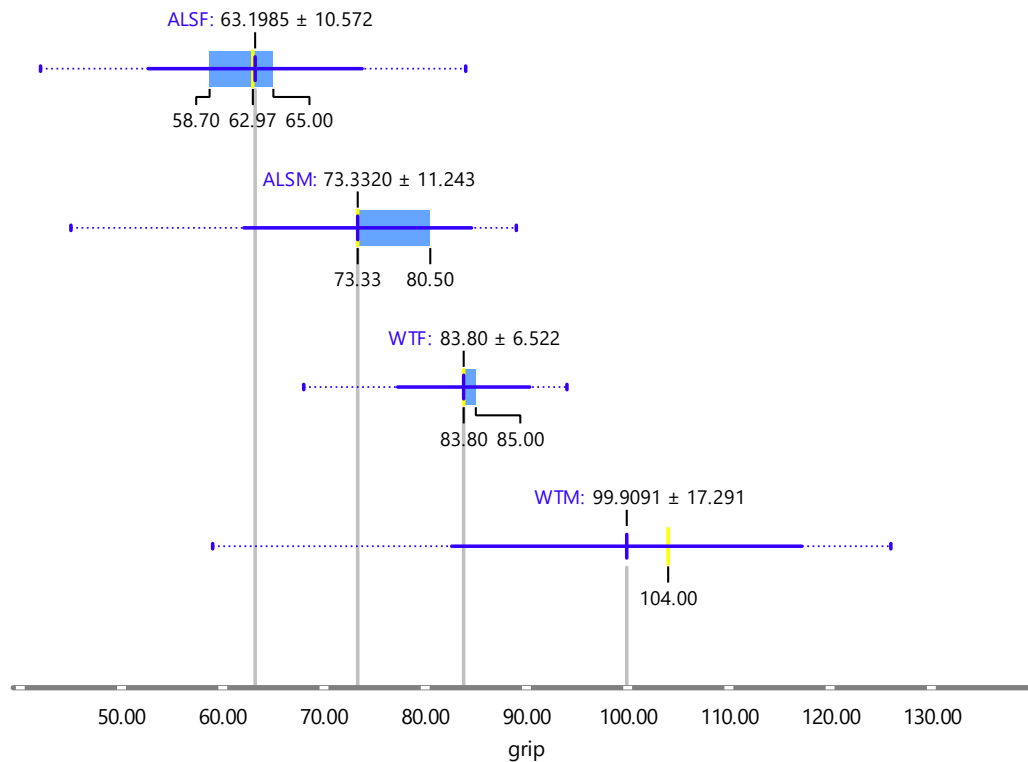
Al contrario l'animale maschio malato tende a non esplorare l'area centrale con il naso e a transitare su traiettorie periferiche. Anche i cambi di direzione sono molto limitati privilegiando movimenti sul perimetro e rimanendo molto fermo nell'angolo in basso a sinistra (Fig. 14).



**Figura 15. Eventi comportamentali nel corso dei 180 secondi centrali dei test.** Pannello A: numero di eventi per tipologia. Pannello B: distribuzione temporale e in relazione alla velocità degli eventi. Pannello C: localizzazione negli eventi di rearing del naso e del corpo. Pannello D: localizzazione negli eventi di grooming del naso e del corpo. Pannello E: localizzazione negli eventi di freezing del naso e del corpo.

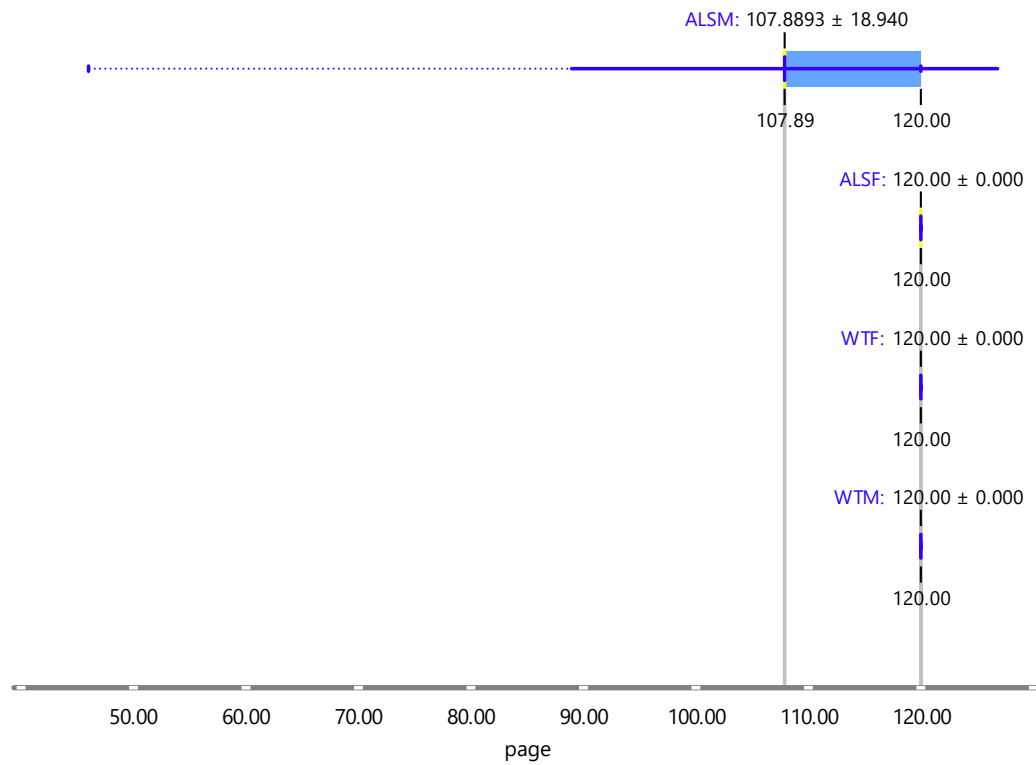
La coordinazione non sembra essere compromessa in questa fase di vita degli animali (Fig. 14), tuttavia i maschi malati tendono ad avere meno efficacia nel rimanere sulla ruota in movimento (Fig. 15). Anche per questo test l'apatia e lo stress potrebbero giocare un ruolo nella compliance a svolgere il test.

L'animale ALSM è meno propenso all'esplorazione come confermato dal numero di rearing mentre incrementa il grooming e compie alcuni eventi di freezing in concomitanza con il grooming stesso. Questi elementi supportano fortemente l'idea che già a 40 giorni i maschi abbiano alterazioni del comportamento che quanto meno li predispongono ad una minore compliance e che ne limitano l'adattamento al cambio di contesto.

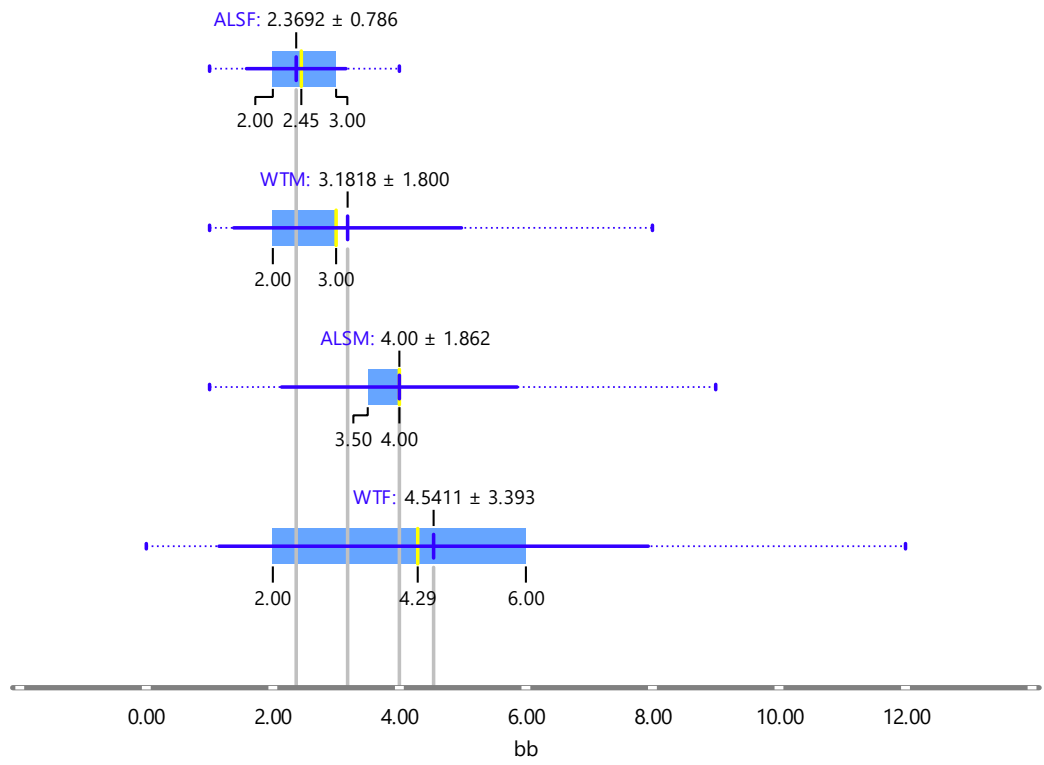


**Figura 16. Diagramma a scatola (boxplot) del punteggio di GRIP.** Le quattro categorie analizzate sono: ALSF, WTF, ALSM e WTM. Ogni scatola rappresenta il range interquartile (IQR), ovvero l'intervallo tra il primo (Q1) e il terzo quartile (Q3), contenendo quindi il 50% centrale dei dati. La linea all'interno di ciascuna scatola rappresenta la media. Whiskers: Le linee che si estendono dalle scatole (whiskers) mostrano la variazione dei dati.

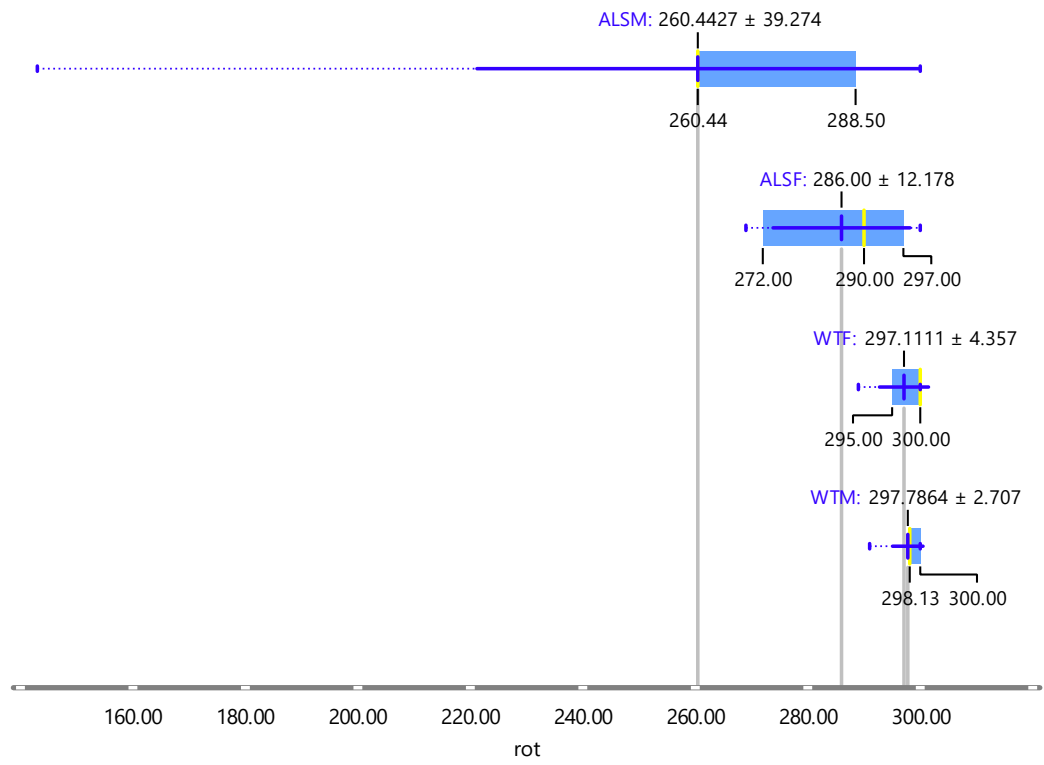
La forza muscolare degli arti anteriore risulta inferiore negli animali malati e nei maschi sembra già cospicua (Fig. 16), tuttavia, il test si presta a bias legati al fatto che l'apatia potrebbe spingere l'animale ad essere meno incline a mantenere la presa senza evidenti deficit muscolari. Infatti, durante il test page (Fig. 17) che è un ulteriore prova della tenacia muscolare il risultato è meno evidente.



**Figura 17. Diagramma a scatola (boxplot) del punteggio di page.** Le quattro categorie analizzate sono: ALSF, WTF, ALSM e WTM. Ogni scatola rappresenta il range interquartile (IQR), ovvero l'intervallo tra il primo (Q1) e il terzo quartile (Q3), contenendo quindi il 50% centrale dei dati. La linea all'interno di ciascuna scatola rappresenta la media. Whiskers: Le linee che si estendono dalle scatole (whiskers) mostrano la variazione dei dati.



**Figura 18. Diagramma a scatola (boxplot) del punteggio di beam balance.** Le quattro categorie analizzate sono: ALSF, WTF, ALSM e WTM. Ogni scatola rappresenta il range interquartile (IQR), ovvero l'intervallo tra il primo (Q1) e il terzo quartile (Q3), contenendo quindi il 50% centrale dei dati. La linea all'interno di ciascuna scatola rappresenta la media. Whiskers: Le linee che si estendono dalle scatole (whiskers) mostrano la variazione dei dati.



**Figura 19. Diagramma a scatola (boxplot) del punteggio al rotarod.** Le quattro categorie analizzate sono: ALSF, WTF, ALSM e WTM. Ogni scatola rappresenta il range interquartile (IQR), ovvero l'intervallo tra il primo (Q1) e il terzo quartile (Q3), contenendo quindi il 50% centrale dei dati. La linea all'interno di ciascuna scatola rappresenta la media. Whiskers: Le linee che si estendono dalle scatole (whiskers) mostrano la variazione dei dati.

## 7. CONCLUSIONI e PROSPETTIVE FUTURE

Il mio lavoro di tesi si inserisce in un contesto portato avanti da moltissimi anni dal gruppo di ricerca Milanese-Bonifacino-Torazza. È la prima volta che viene monitorato il modello G93A dai 40 giorni a fine vita con l'applicazione di 5 test comportamentali ogni 10 giorni e la registrazione di Terabyte di video che sono stati analizzati con 2 algoritmi di machine learning. Per brevità abbiamo deciso di presentare esclusivamente i dati allo starting point in quanto già significativi della 'gender progression' della patologia. Abbiamo individuato grazie a questa analisi sintomi precoci riferibili all'apatia/stress e stabilito quali test sono meno significativi perché viziati dalla presenza di un sottostante cambiamento motivazionale. Questo lavoro sarà molto utile per raffinare il modello e l'experimental design' individuando gli outliers, stabilendo trattamenti farmacologici mirati alla fase precoce, consentendo di trovare nuovi target farmacologici. In particolare, stiamo cercando di utilizzare i dati ottenuti per individuare se, e quando, maschi e femmine si sovrappongono per sintomatologia. Contemporaneamente stiamo cercando di valutare biomarker significativi per ogni fase della malattia che quindi evolve ma ha un impatto già dalle fasi precoci.

## 8. BIBLIOGRAFIA

1. Dugger, B.N.; Dickson, D.W. Pathology of Neurodegenerative Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2017**, *9*, a028035, doi:10.1101/cshperspect.a028035.
2. Villa, C.; Paudel, Y.N.; Piperi, C. New Insights into Molecular Mechanisms Underlying Neurodegenerative Disorders. *Brain Sci* **2022**, *12*, 1190, doi:10.3390/brainsci12091190.
3. Duranti, E.; Villa, C. Molecular Investigations of Protein Aggregation in the Pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Int J Mol Sci* **2022**, *24*, 704, doi:10.3390/ijms24010704.
4. Duranti, E.; Villa, C. Muscle Involvement in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Understanding the Pathogenesis and Advancing Therapeutics. *Biomolecules* **2023**, *13*, 1582, doi:10.3390/biom13111582.
5. Bastin, C.; Giacomelli, F.; Miévis, F.; Lemaire, C.; Guillaume, B.; Salmon, E. Anosognosia in Mild Cognitive Impairment: Lack of Awareness of Memory Difficulties Characterizes Prodromal Alzheimer's Disease. *Front Psychiatry* **2021**, *12*, doi:10.3389/fpsy.2021.631518.
6. Scheltens, P.; De Strooper, B.; Kivipelto, M.; Holstege, H.; Chételat, G.; Teunissen, C.E.; Cummings, J.; van der Flier, W.M. Alzheimer's Disease. *The Lancet* **2021**, *397*, 1577–1590, doi:10.1016/S0140-6736(20)32205-4.
7. Váradi, C. Clinical Features of Parkinson's Disease: The Evolution of Critical Symptoms. *Biology (Basel)* **2020**, *9*, 103, doi:10.3390/biology9050103.
8. Palanisamy, C.P.; Pei, J.; Alugoju, P.; Anthikapalli, N.V.A.; Jayaraman, S.; Veeraraghavan, V.P.; Gopathy, S.; Roy, J.R.; Janaki, C.S.; Thalamati, D.; et al. New Strategies of Neurodegenerative Disease Treatment with Extracellular Vesicles (EVs) Derived from Mesenchymal Stem Cells (MSCs). *Theranostics* **2023**, *13*, 4138–4165, doi:10.7150/thno.83066.
9. Gitler, A.D.; Dhillon, P.; Shorter, J. Neurodegenerative Disease: Models, Mechanisms, and a New Hope. *Dis Model Mech* **2017**, *10*, 499–502, doi:10.1242/dmm.030205.

10. Mallucci, G.R.; Klenerman, D.; Rubinsztein, D.C. Developing Therapies for Neurodegenerative Disorders: Insights from Protein Aggregation and Cellular Stress Responses. *Annu Rev Cell Dev Biol* **2020**, *36*, 165–189, doi:10.1146/annurev-cellbio-040320-120625.
11. Schaffert, L.-N.; Carter, W.G. Do Post-Translational Modifications Influence Protein Aggregation in Neurodegenerative Diseases: A Systematic Review. *Brain Sci* **2020**, *10*, 232, doi:10.3390/brainsci10040232.
12. Candelise, N.; Scaricamazza, S.; Salvatori, I.; Ferri, A.; Valle, C.; Manganelli, V.; Garofalo, T.; Sorice, M.; Misasi, R. Protein Aggregation Landscape in Neurodegenerative Diseases: Clinical Relevance and Future Applications. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, 6016, doi:10.3390/ijms22116016.
13. Duranti, E.; Villa, C. Insights into Dysregulated Neurological Biomarkers in Cancer. *Cancers (Basel)* **2024**, *16*, 2680, doi:10.3390/cancers16152680.
14. Burtscher, J.; Millet, G.P.; Place, N.; Kayser, B.; Zanou, N. The Muscle-Brain Axis and Neurodegenerative Diseases: The Key Role of Mitochondria in Exercise-Induced Neuroprotection. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, 6479, doi:10.3390/ijms22126479.
15. Bian, X.; Wang, Q.; Wang, Y.; Lou, S. The Function of Previously Unappreciated Exerkines Secreted by Muscle in Regulation of Neurodegenerative Diseases. *Front Mol Neurosci* **2024**, *16*, doi:10.3389/fnmol.2023.1305208.
16. Shefner, J.M.; Musaro, A.; Ngo, S.T.; Lunetta, C.; Steyn, F.J.; Robitaille, R.; De Carvalho, M.; Rutkove, S.; Ludolph, A.C.; Dupuis, L. Skeletal Muscle in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Brain* **2023**, *146*, 4425–4436, doi:10.1093/brain/awad202.
17. Beerli, M.S.; Leugrants, S.E.; Delbono, O.; Bennett, D.A.; Buchman, A.S. Sarcopenia Is Associated with Incident Alzheimer’s Dementia, m <scp>ild Cognitive Impairment,</Scp> and Cognitive Decline. *J Am Geriatr Soc* **2021**, *69*, 1826–1835, doi:10.1111/jgs.17206.
18. Raleigh, S.M.; Orchard, K.J.A. Sarcopenia as a Risk Factor for Alzheimer’s Disease: Genetic and Epigenetic Perspectives. *Genes (Basel)* **2024**, *15*, 561, doi:10.3390/genes15050561.

19. Halli-Tierney, A.D.; Luker, J.; Carroll, D.G. Parkinson Disease. *Am Fam Physician* **2020**, *102*, 679–691.
20. Ferreira-Sánchez, M. del R.; Moreno-Verdú, M.; Cano-de-la-Cuerda, R. Quantitative Measurement of Rigidity in Parkinson's Disease: A Systematic Review. *Sensors* **2020**, *20*, 880, doi:10.3390/s20030880.
21. Kreilhaus, F.; Guerra, S.; Masanetz, R.; Menne, V.; Yerbury, J.; Karl, T. Novel Behavioural Characteristics of the *Superoxide Dismutase 1 G93A* ( *SOD1*<sup>G93A</sup> ) Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis Include Sex-dependent Phenotypes. *Genes Brain Behav* **2020**, *19*, doi:10.1111/gbb.12604.
22. David, G.; Nguyen, K.; Barrett, E.F. Early Vulnerability to Ischemia/Reperfusion Injury in Motor Terminals Innervating Fast Muscles of SOD1-G93A Mice. *Exp Neurol* **2007**, *204*, 411–420, doi:10.1016/j.expneurol.2006.12.021.
23. Valdez, G.; Tapia, J.C.; Lichtman, J.W.; Fox, M.A.; Sanes, J.R. Shared Resistance to Aging and ALS in Neuromuscular Junctions of Specific Muscles. *PLoS One* **2012**, *7*, e34640, doi:10.1371/journal.pone.0034640.
24. Grant, R.A.; Sharp, P.S.; Kennerley, A.J.; Berwick, J.; Grierson, A.; Ramesh, T.; Prescott, T.J. Abnormalities in Whisking Behaviour Are Associated with Lesions in Brain Stem Nuclei in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Behavioural Brain Research* **2014**, *259*, 274–283, doi:10.1016/j.bbr.2013.11.002.
25. Peggion, C.; Scalcon, V.; Massimino, M.L.; Nies, K.; Lopreiato, R.; Rigobello, M.P.; Bertoli, A. SOD1 in ALS: Taking Stock in Pathogenic Mechanisms and the Role of Glial and Muscle Cells. *Antioxidants* **2022**, *11*, 614, doi:10.3390/antiox11040614.
26. Kim, R.B.; Irvin, C.W.; Tilva, K.R.; Mitchell, C.S. State of the Field: An Informatics-Based Systematic Review of the SOD1-G93A Amyotrophic Lateral Sclerosis Transgenic Mouse Model. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* **2016**, *17*, 1–14, doi:10.3109/21678421.2015.1047455.
27. Morrison, B.M.; Morrison, J.H. Amyotrophic Lateral Sclerosis Associated with Mutations in Superoxide Dismutase: A Putative Mechanism of Degeneration. *Brain Res Rev* **1999**, *29*, 121–135, doi:10.1016/S0165-0173(98)00049-6.

28. Milanese, M.; Zappettini, S.; Onofri, F.; Musazzi, L.; Tardito, D.; Bonifacino, T.; Messa, M.; Racagni, G.; Usai, C.; Benfenati, F.; et al. Abnormal Exocytotic Release of Glutamate in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Neurochem* **2011**, *116*, 1028–1042, doi:10.1111/j.1471-4159.2010.07155.x.
29. Ferraiuolo, L.; Kirby, J.; Grierson, A.J.; Sendtner, M.; Shaw, P.J. Molecular Pathways of Motor Neuron Injury in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Nat Rev Neurol* **2011**, *7*, 616–630, doi:10.1038/nrneurol.2011.152.
30. Nijssen, J.; Comley, L.H.; Hedlund, E. Motor Neuron Vulnerability and Resistance in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Acta Neuropathol* **2017**, *133*, 863–885, doi:10.1007/s00401-017-1708-8.
31. Le Gall, L.; Anakor, E.; Connolly, O.; Vijayakumar, U.; Duddy, W.; Duguez, S. Molecular and Cellular Mechanisms Affected in ALS. *J Pers Med* **2020**, *10*, 101, doi:10.3390/jpm10030101.
32. Prasad, A.; Bharathi, V.; Sivalingam, V.; Girdhar, A.; Patel, B.K. Molecular Mechanisms of TDP-43 Misfolding and Pathology in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front Mol Neurosci* **2019**, *12*, doi:10.3389/fnmol.2019.00025.
33. Cunha-Oliveira, T.; Montezinho, L.; Mendes, C.; Firuzi, O.; Saso, L.; Oliveira, P.J.; Silva, F.S.G. Oxidative Stress in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Pathophysiology and Opportunities for Pharmacological Intervention. *Oxid Med Cell Longev* **2020**, *2020*, 1–29, doi:10.1155/2020/5021694.
34. Motataianu, A.; Serban, G.; Barcutean, L.; Balasa, R. Oxidative Stress in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Synergy of Genetic and Environmental Factors. *Int J Mol Sci* **2022**, *23*, 9339, doi:10.3390/ijms23169339.
35. Huai, J.; Zhang, Z. Structural Properties and Interaction Partners of Familial ALS-Associated SOD1 Mutants. *Front Neurol* **2019**, *10*, doi:10.3389/fneur.2019.00527.
36. Cozzolino, M.; Carrì, M.T. Mitochondrial Dysfunction in ALS. *Prog Neurobiol* **2012**, *97*, 54–66, doi:10.1016/j.pneurobio.2011.06.003.
37. Smith, E.F.; Shaw, P.J.; De Vos, K.J. The Role of Mitochondria in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurosci Lett* **2019**, *710*, 132933, doi:10.1016/j.neulet.2017.06.052.

38. Li, Q.; Haney, M.S. The Role of Glia in Protein Aggregation. *Neurobiol Dis* **2020**, *143*, 105015, doi:10.1016/j.nbd.2020.105015.
39. Liu, J.; Wang, F. Role of Neuroinflammation in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Cellular Mechanisms and Therapeutic Implications. *Front Immunol* **2017**, *8*, doi:10.3389/fimmu.2017.01005.
40. Castellanos-Montiel, M.J.; Chaineau, M.; Durcan, T.M. The Neglected Genes of ALS: Cytoskeletal Dynamics Impact Synaptic Degeneration in ALS. *Front Cell Neurosci* **2020**, *14*, doi:10.3389/fncel.2020.594975.
41. Loeffler, J.; Picchiarelli, G.; Dupuis, L.; Gonzalez De Aguilar, J. The Role of Skeletal Muscle in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Brain Pathology* **2016**, *26*, 227–236, doi:10.1111/bpa.12350.
42. Nixon, R.A. The Role of Autophagy in Neurodegenerative Disease. *Nat Med* **2013**, *19*, 983–997, doi:10.1038/nm.3232.
43. Fleming, A.; Bourdenx, M.; Fujimaki, M.; Karabiyik, C.; Krause, G.J.; Lopez, A.; Martín-Segura, A.; Puri, C.; Scrivo, A.; Skidmore, J.; et al. The Different Autophagy Degradation Pathways and Neurodegeneration. *Neuron* **2022**, *110*, 935–966, doi:10.1016/j.neuron.2022.01.017.
44. Schoser, B.G.H.; Wehling, S.; Blottner, D. Cell Death and Apoptosis-related Proteins in Muscle Biopsies of Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis and Polyneuropathy. *Muscle Nerve* **2001**, *24*, 1083–1089, doi:10.1002/mus.1114.
45. Manzano, R.; Toivonen, J.M.; Moreno-Martínez, L.; de la Torre, M.; Moreno-García, L.; López-Royo, T.; Molina, N.; Zaragoza, P.; Calvo, A.C.; Osta, R. What Skeletal Muscle Has to Say in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Implications for Therapy. *Br J Pharmacol* **2021**, *178*, 1279–1297, doi:10.1111/bph.15276.
46. Xiao, Y.; Ma, C.; Yi, J.; Wu, S.; Luo, G.; Xu, X.; Lin, P.-H.; Sun, J.; Zhou, J. Suppressed Autophagy Flux in Skeletal Muscle of an Amyotrophic Lateral Sclerosis Mouse Model during Disease Progression. *Physiol Rep* **2015**, *3*, e12271, doi:10.14814/phy2.12271.
47. Chen, W.; Guo, L.; Li, M.; Wei, C.; Li, S.; Xu, R. The Pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis: Mitochondrial Dysfunction, Protein Misfolding and Epigenetics. *Brain Res* **2022**, *1786*, 147904, doi:10.1016/j.brainres.2022.147904.

48. Chan, Y.; Alix, J.J.P.; Neuwirth, C.; Barkhaus, P.E.; Castro, J.; Jenkins, T.M.; McDermott, C.J.; Shaw, P.J.; de Carvalho, M.; Nandedkar, S.; et al. Reinnervation as Measured by the Motor Unit Size Index Is Associated with Preservation of Muscle Strength in Amyotrophic Lateral Sclerosis, but Not All Muscles Reinnervate. *Muscle Nerve* **2022**, *65*, 203–210, doi:10.1002/mus.27444.
49. Leermakers, P.A.; Skov, M.; Riisager, A.; Nielsen, O.B.; Pedersen, T.H. Alterations in Fast-twitch Muscle Membrane Conductance Regulation Do Not Explain Decreased Muscle Function of <scp>SOD1<sup>G93A</sup> </Scp> Rats. *Muscle Nerve* **2021**, *64*, 755–764, doi:10.1002/mus.27413.
50. Quessada, C.; Bouscary, A.; René, F.; Valle, C.; Ferri, A.; Ngo, S.T.; Loeffler, J.-P. Skeletal Muscle Metabolism: Origin or Prognostic Factor for Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) Development? *Cells* **2021**, *10*, 1449, doi:10.3390/cells10061449.
51. Anderson, G. Amyotrophic Lateral Sclerosis Pathoetiology and Pathophysiology: Roles of Astrocytes, Gut Microbiome, and Muscle Interactions via the Mitochondrial Melatonergic Pathway, with Disruption by Glyphosate-Based Herbicides. *Int J Mol Sci* **2022**, *24*, 587, doi:10.3390/ijms24010587.
52. Peggion, C.; Scalcon, V.; Massimino, M.L.; Nies, K.; Lopreiato, R.; Rigobello, M.P.; Bertoli, A. SOD1 in ALS: Taking Stock in Pathogenic Mechanisms and the Role of Glial and Muscle Cells. *Antioxidants* **2022**, *11*, 614, doi:10.3390/antiox11040614.
53. Venditti, P.; Di Meo, S. The Role of Reactive Oxygen Species in the Life Cycle of the Mitochondrion. *Int J Mol Sci* **2020**, *21*, 2173, doi:10.3390/ijms21062173.
54. Lu, C.-H.; Allen, K.; Oei, F.; Leoni, E.; Kuhle, J.; Tree, T.; Fratta, P.; Sharma, N.; Sidle, K.; Howard, R.; et al. Systemic Inflammatory Response and Neuromuscular Involvement in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* **2016**, *3*, doi:10.1212/NXI.0000000000000244.
55. A. McCombe, P.; D. Henderson, R. The Role of Immune and Inflammatory Mechanisms in ALS. *Curr Mol Med* **2011**, *11*, 246–254, doi:10.2174/156652411795243450.

56. Liu, W.; Chakkalakal, J. V. The Composition, Development, and Regeneration of Neuromuscular Junctions. In; 2018; pp. 99–124.
57. Martineau, É.; Di Polo, A.; Vande Velde, C.; Robitaille, R. Dynamic Neuromuscular Remodeling Precedes Motor-Unit Loss in a Mouse Model of ALS. *Elife* **2018**, *7*, doi:10.7554/eLife.41973.
58. Pikatza-Menoio, O.; Elicegui, A.; Bengoetxea, X.; Naldaiz-Gastesi, N.; López de Munain, A.; Gerenu, G.; Gil-Bea, F.J.; Alonso-Martín, S. The Skeletal Muscle Emerges as a New Disease Target in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Pers Med* **2021**, *11*, 671, doi:10.3390/jpm11070671.
59. Le Grand, F.; Rudnicki, M. Satellite and Stem Cells in Muscle Growth and Repair. *Development* **2007**, *134*, 3953–3957, doi:10.1242/dev.005934.
60. Clement, A.M.; Nguyen, M.D.; Roberts, E.A.; Garcia, M.L.; Boillée, S.; Rule, M.; McMahon, A.P.; Doucette, W.; Siwek, D.; Ferrante, R.J.; et al. Wild-Type Nonneuronal Cells Extend Survival of SOD1 Mutant Motor Neurons in ALS Mice. *Science (1979)* **2003**, *302*, 113–117, doi:10.1126/science.1086071.
61. Blackburn, D.; Sargsyan, S.; Monk, P.N.; Shaw, P.J. Astrocyte Function and Role in Motor Neuron Disease: A Future Therapeutic Target? *Glia* **2009**, *57*, 1251–1264, doi:10.1002/glia.20848.
62. Maragakis, N.J.; Rothstein, J.D. Mechanisms of Disease: Astrocytes in Neurodegenerative Disease. *Nat Clin Pract Neurol* **2006**, *2*, 679–689, doi:10.1038/ncpneuro0355.
63. Sloan, S.A.; Barres, B.A. Mechanisms of Astrocyte Development and Their Contributions to Neurodevelopmental Disorders. *Curr Opin Neurobiol* **2014**, *27*, 75–81, doi:10.1016/j.conb.2014.03.005.
64. Ullian, E.M.; Christopherson, K.S.; Barres, B.A. Role for Glia in Synaptogenesis. *Glia* **2004**, *47*, 209–216, doi:10.1002/glia.20082.
65. Liddelow, S.A.; Guttenplan, K.A.; Clarke, L.E.; Bennett, F.C.; Bohlen, C.J.; Schirmer, L.; Bennett, M.L.; Münch, A.E.; Chung, W.-S.; Peterson, T.C.; et al. Neurotoxic Reactive Astrocytes Are Induced by Activated Microglia. *Nature* **2017**, *541*, 481–487, doi:10.1038/nature21029.
66. Yamanaka, K.; Chun, S.J.; Boillee, S.; Fujimori-Tonou, N.; Yamashita, H.; Gutmann, D.H.; Takahashi, R.; Misawa, H.; Cleveland, D.W. Astrocytes as

- Determinants of Disease Progression in Inherited Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Nat Neurosci* **2008**, *11*, 251–253, doi:10.1038/nn2047.
67. Di Giorgio, F.P.; Boulting, G.L.; Bobrowicz, S.; Eggan, K.C. Human Embryonic Stem Cell-Derived Motor Neurons Are Sensitive to the Toxic Effect of Glial Cells Carrying an ALS-Causing Mutation. *Cell Stem Cell* **2008**, *3*, 637–648, doi:10.1016/j.stem.2008.09.017.
68. Di Giorgio, F.P.; Carrasco, M.A.; Siao, M.C.; Maniatis, T.; Eggan, K. Non-Cell Autonomous Effect of Glia on Motor Neurons in an Embryonic Stem Cell-Based ALS Model. *Nat Neurosci* **2007**, *10*, 608–614, doi:10.1038/nn1885.
69. Hochstim, C.; Deneen, B.; Lukaszewicz, A.; Zhou, Q.; Anderson, D.J. Identification of Positionally Distinct Astrocyte Subtypes Whose Identities Are Specified by a Homeodomain Code. *Cell* **2008**, *133*, 510–522, doi:10.1016/j.cell.2008.02.046.
70. Molofsky, A. V.; Kelley, K.W.; Tsai, H.-H.; Redmond, S.A.; Chang, S.M.; Madireddy, L.; Chan, J.R.; Baranzini, S.E.; Ullian, E.M.; Rowitch, D.H. Astrocyte-Encoded Positional Cues Maintain Sensorimotor Circuit Integrity. *Nature* **2014**, *509*, 189–194, doi:10.1038/nature13161.
71. Ginhoux, F.; Lim, S.; Hoeffel, G.; Low, D.; Huber, T. Origin and Differentiation of Microglia. *Front Cell Neurosci* **2013**, *7*, doi:10.3389/fncel.2013.00045.
72. Hall, E.D.; Oostveen, J.A.; Gurney, M.E. Relationship of Microglial and Astrocytic Activation to Disease Onset and Progression in a Transgenic Model of Familial ALS. *Glia* **1998**, *23*, 249–256, doi:10.1002/(sici)1098-1136(199807)23:3<249::aid-glia7>3.0.co;2-#.
73. Schafer, D.P.; Lehrman, E.K.; Kautzman, A.G.; Koyama, R.; Mardinly, A.R.; Yamasaki, R.; Ransohoff, R.M.; Greenberg, M.E.; Barres, B.A.; Stevens, B. Microglia Sculpt Postnatal Neural Circuits in an Activity and Complement-Dependent Manner. *Neuron* **2012**, *74*, 691–705, doi:10.1016/j.neuron.2012.03.026.
74. Boillée, S.; Yamanaka, K.; Lobsiger, C.S.; Copeland, N.G.; Jenkins, N.A.; Kassiotis, G.; Kollias, G.; Cleveland, D.W. Onset and Progression in Inherited ALS Determined by Motor Neurons and Microglia. *Science (1979)* **2006**, *312*, 1389–1392, doi:10.1126/science.1123511.

75. Frakes, A.E.; Ferraiuolo, L.; Haidet-Phillips, A.M.; Schmelzer, L.; Braun, L.; Miranda, C.J.; Ladner, K.J.; Bevan, A.K.; Foust, K.D.; Godbout, J.P.; et al. Microglia Induce Motor Neuron Death via the Classical NF- $\kappa$ B Pathway in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neuron* **2014**, *81*, 1009–1023, doi:10.1016/j.neuron.2014.01.013.
76. Mesci, P.; Zaïdi, S.; Lobsiger, C.S.; Millecamps, S.; Escartin, C.; Seilhean, D.; Sato, H.; Mallat, M.; Boillée, S. System XC<sup>-</sup> Is a Mediator of Microglial Function and Its Deletion Slows Symptoms in Amyotrophic Lateral Sclerosis Mice. *Brain* **2015**, *138*, 53–68, doi:10.1093/brain/awu312.
77. Lee, Y.; Morrison, B.M.; Li, Y.; Lengacher, S.; Farah, M.H.; Hoffman, P.N.; Liu, Y.; Tsingalia, A.; Jin, L.; Zhang, P.-W.; et al. Oligodendroglia Metabolically Support Axons and Contribute to Neurodegeneration. *Nature* **2012**, *487*, 443–448, doi:10.1038/nature11314.
78. Rinholm, J.E.; Hamilton, N.B.; Kessaris, N.; Richardson, W.D.; Bergersen, L.H.; Attwell, D. Regulation of Oligodendrocyte Development and Myelination by Glucose and Lactate. *The Journal of Neuroscience* **2011**, *31*, 538–548, doi:10.1523/JNEUROSCI.3516-10.2011.
79. Kang, S.H.; Li, Y.; Fukaya, M.; Lorenzini, I.; Cleveland, D.W.; Ostrow, L.W.; Rothstein, J.D.; Bergles, D.E. Degeneration and Impaired Regeneration of Gray Matter Oligodendrocytes in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Nat Neurosci* **2013**, *16*, 571–579, doi:10.1038/nn.3357.
80. Woodhoo, A.; Sommer, L. Development of the Schwann Cell Lineage: From the Neural Crest to the Myelinated Nerve. *Glia* **2008**, *56*, 1481–1490, doi:10.1002/glia.20723.
81. Hanyu, N.; Oguchi, K.; Yanagisawa, N.; Tsukagoshi, H. Degeneration and Regeneration of Ventral Root Motor Fibers in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Neurol Sci* **1982**, *55*, 99–115, doi:10.1016/0022-510X(82)90173-3.
82. Mancuso, R.; Martínez-Muriana, A.; Leiva, T.; Gregorio, D.; Ariza, L.; Morell, M.; Esteban-Pérez, J.; García-Redondo, A.; Calvo, A.C.; Atencia-Cebreiro, G.; et al. Neuregulin-1 Promotes Functional Improvement by Enhancing Collateral Sprouting in SOD1G93A ALS Mice and after Partial Muscle Denervation. *Neurobiol Dis* **2016**, *95*, 168–178, doi:10.1016/j.nbd.2016.07.023.

83. Syed, N.; Kim, H.A. Soluble Neuregulin and Schwann Cell Myelination: A Therapeutic Potential for Improving Remyelination of Adult Axons. *Mol Cell Pharmacol* **2010**, *2*, 161–167, doi:10.4255/mcpharmacol.10.22.
84. Lobsiger, C.S.; Boillee, S.; McAlonis-Downes, M.; Khan, A.M.; Feltri, M.L.; Yamanaka, K.; Cleveland, D.W. Schwann Cells Expressing Dismutase Active Mutant SOD1 Unexpectedly Slow Disease Progression in ALS Mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2009**, *106*, 4465–4470, doi:10.1073/pnas.0813339106.
85. Van Hoecke, A.; Schoonaert, L.; Lemmens, R.; Timmers, M.; Staats, K.A.; Laird, A.S.; Peeters, E.; Philips, T.; Goris, A.; Dubois, B.; et al. EPHA4 Is a Disease Modifier of Amyotrophic Lateral Sclerosis in Animal Models and in Humans. *Nat Med* **2012**, *18*, 1418–1422, doi:10.1038/nm.2901.
86. Wang, L.; Pytel, P.; Feltri, M.L.; Wrabetz, L.; Roos, R.P. Selective Knockdown of Mutant SOD1 in Schwann Cells Ameliorates Disease in G85R Mutant SOD1 Transgenic Mice. *Neurobiol Dis* **2012**, *48*, 52–57, doi:10.1016/j.nbd.2012.05.014.
87. Hollyday, M.; Hamburger, V. Reduction of the Naturally Occurring Motor Neuron Loss by Enlargement of the Periphery. *Journal of Comparative Neurology* **1976**, *170*, 311–320, doi:10.1002/cne.901700304.
88. Dobrowolny, G.; Aucello, M.; Rizzuto, E.; Beccafico, S.; Mammucari, C.; Bonconpagni, S.; Belia, S.; Wannenes, F.; Nicoletti, C.; Del Prete, Z.; et al. Skeletal Muscle Is a Primary Target of SOD1G93A-Mediated Toxicity. *Cell Metab* **2008**, *8*, 425–436, doi:10.1016/j.cmet.2008.09.002.
89. Miller, T.M.; Kim, S.H.; Yamanaka, K.; Hester, M.; Umapathi, P.; Arnson, H.; Rizo, L.; Mendell, J.R.; Gage, F.H.; Cleveland, D.W.; et al. Gene Transfer Demonstrates That Muscle Is Not a Primary Target for Non-Cell-Autonomous Toxicity in Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2006**, *103*, 19546–19551, doi:10.1073/pnas.0609411103.
90. Wong, M.; Martin, L.J. Skeletal Muscle-Restricted Expression of Human SOD1 Causes Motor Neuron Degeneration in Transgenic Mice. *Hum Mol Genet* **2010**, *19*, 2284–2302, doi:10.1093/hmg/ddq106.

91. Cashman, N.R.; Durham, H.D.; Blusztajn, J.K.; Oda, K.; Tabira, T.; Shaw, I.T.; Dahrouge, S.; Antel, J.P. Neuroblastoma × Spinal Cord (NSC) Hybrid Cell Lines Resemble Developing Motor Neurons. *Developmental Dynamics* **1992**, *194*, 209–221, doi:10.1002/aja.1001940306.
92. Cookson, M.R.; Menzies, F.M.; Manning, P.; Eggett, C.J.; Figlewicz, D.A.; McNeil, C.J.; Shaw, P.J. Cu/Zn Superoxide Dismutase (SOD1) Mutations Associated with Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) Affect Cellular Free Radical Release in the Presence of Oxidative Stress. *Amyotrophic Lateral Sclerosis* **2002**, *3*, 75–85, doi:10.1080/146608202760196048.
93. Allen, S.; Heath, P.R.; Kirby, J.; Wharton, S.B.; Cookson, M.R.; Menzies, F.M.; Banks, R.E.; Shaw, P.J. Analysis of the Cytosolic Proteome in a Cell Culture Model of Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis Reveals Alterations to the Proteasome, Antioxidant Defenses, and Nitric Oxide Synthetic Pathways. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*, 6371–6383, doi:10.1074/jbc.M209915200.
94. Rizzardini, M.; Mangolini, A.; Lupi, M.; Ubezio, P.; Bendotti, C.; Cantoni, L. Low Levels of ALS-Linked Cu/Zn Superoxide Dismutase Increase the Production of Reactive Oxygen Species and Cause Mitochondrial Damage and Death in Motor Neuron-like Cells. *J Neurol Sci* **2005**, *232*, 95–103, doi:10.1016/j.jns.2005.02.004.
95. Ferri, A.; Cozzolino, M.; Crosio, C.; Nencini, M.; Casciati, A.; Gralla, E.B.; Rotilio, G.; Valentine, J.S.; Carri, M.T. Familial ALS-Superoxide Dismutases Associate with Mitochondria and Shift Their Redox Potentials. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2006**, *103*, 13860–13865, doi:10.1073/pnas.0605814103.
96. Gomes, C.; Palma, A.S.; Almeida, R.; Regalla, M.; McCluskey, L.F.; Trojanowski, J.Q.; Costa, J. Establishment of a Cell Model of ALS Disease: Golgi Apparatus Disruption Occurs Independently from Apoptosis. *Biotechnol Lett* **2008**, *30*, 603–610, doi:10.1007/s10529-007-9595-z.
97. Takahashi, K.; Tanabe, K.; Ohnuki, M.; Narita, M.; Ichisaka, T.; Tomoda, K.; Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* **2007**, *131*, 861–872, doi:10.1016/j.cell.2007.11.019.

98. Chang, C.-Y.; Ting, H.-C.; Liu, C.-A.; Su, H.-L.; Chiou, T.-W.; Lin, S.-Z.; Harn, H.-J.; Ho, T.-J. Induced Pluripotent Stem Cell (iPSC)-Based Neurodegenerative Disease Models for Phenotype Recapitulation and Drug Screening. *Molecules* **2020**, *25*, 2000, doi:10.3390/molecules25082000.
99. Karagiannis, P.; Inoue, H. ALS, a Cellular Whodunit on Motor Neuron Degeneration. *Molecular and Cellular Neuroscience* **2020**, *107*, 103524, doi:10.1016/j.mcn.2020.103524.
100. Kryndushkin, D.; Shewmaker, F. Modeling ALS and FTL D Proteinopathies in Yeast: An Efficient Approach for Studying Protein Aggregation and Toxicity. *Prion* **2011**, *5*, 250–257, doi:10.4161/pri.17229.
101. Chernoff, Y.O.; Grizel, A. V.; Rubel, A.A.; Zelinsky, A.A.; Chandramowliswaran, P.; Chernova, T.A. Application of Yeast to Studying Amyloid and Prion Diseases. In; 2020; pp. 293–380.
102. Rencus-Lazar, S.; DeRowe, Y.; Adsi, H.; Gazit, E.; Laor, D. Yeast Models for the Study of Amyloid-Associated Disorders and Development of Future Therapy. *Front Mol Biosci* **2019**, *6*, doi:10.3389/fmolb.2019.00015.
103. Di Gregorio, S.E.; Duennwald, M.L. ALS Yeast Models—Past Success Stories and New Opportunities. *Front Mol Neurosci* **2018**, *11*, doi:10.3389/fnmol.2018.00394.
104. Jovičić, A.; Mertens, J.; Boeynaems, S.; Bogaert, E.; Chai, N.; Yamada, S.B.; Paul, J.W.; Sun, S.; Herdy, J.R.; Bieri, G.; et al. Modifiers of C9orf72 Dipeptide Repeat Toxicity Connect Nucleocytoplasmic Transport Defects to FTD/ALS. *Nat Neurosci* **2015**, *18*, 1226–1229, doi:10.1038/nn.4085.
105. Bastow, E.L.; Peswani, A.R.; Tarrant, D.S.J.; Pentland, D.R.; Chen, X.; Morgan, A.; Staniforth, G.L.; Tullet, J.M.; Rowe, M.L.; Howard, M.J.; et al. New Links between *SOD1* and Metabolic Dysfunction from a Yeast Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Cell Sci* **2016**, *129*, 4118–4129, doi:10.1242/jcs.190298.
106. Gal, J.; Zhang, J.; Kwinter, D.M.; Zhai, J.; Jia, H.; Jia, J.; Zhu, H. Nuclear Localization Sequence of FUS and Induction of Stress Granules by ALS Mutants. *Neurobiol Aging* **2011**, *32*, 2323.e27–2323.e40, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2010.06.010.

107. Park, S.-K.; Arslan, F.; Kanneganti, V.; Barmada, S.J.; Purushothaman, P.; Verma, S.C.; Liebman, S.W. Overexpression of a Conserved HSP40 Chaperone Reduces Toxicity of Several Neurodegenerative Disease Proteins. *Prion* **2018**, *12*, 16–22, doi:10.1080/19336896.2017.1423185.
108. Sun, Z.; Diaz, Z.; Fang, X.; Hart, M.P.; Chesi, A.; Shorter, J.; Gitler, A.D. Molecular Determinants and Genetic Modifiers of Aggregation and Toxicity for the ALS Disease Protein FUS/TLS. *PLoS Biol* **2011**, *9*, e1000614, doi:10.1371/journal.pbio.1000614.
109. Ju, S.; Tardiff, D.F.; Han, H.; Divya, K.; Zhong, Q.; Maquat, L.E.; Bosco, D.A.; Hayward, L.J.; Brown, R.H.; Lindquist, S.; et al. A Yeast Model of FUS/TLS-Dependent Cytotoxicity. *PLoS Biol* **2011**, *9*, e1001052, doi:10.1371/journal.pbio.1001052.
110. Yemini, E.; Jucikas, T.; Grundy, L.J.; Brown, A.E.X.; Schafer, W.R. A Database of Caenorhabditis Elegans Behavioral Phenotypes. *Nat Methods* **2013**, *10*, 877–879, doi:10.1038/nmeth.2560.
111. Therrien, M.; Parker, J.A. Worming Forward: Amyotrophic Lateral Sclerosis Toxicity Mechanisms and Genetic Interactions in Caenorhabditis Elegans. *Front Genet* **2014**, *5*, doi:10.3389/fgene.2014.00085.
112. Oeda, T. Oxidative Stress Causes Abnormal Accumulation of Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis-Related Mutant SOD1 in Transgenic Caenorhabditis Elegans. *Hum Mol Genet* **2001**, *10*, 2013–2023, doi:10.1093/hmg/10.19.2013.
113. Wang, J.; Farr, G.W.; Hall, D.H.; Li, F.; Furtak, K.; Dreier, L.; Horwich, A.L. An ALS-Linked Mutant SOD1 Produces a Locomotor Defect Associated with Aggregation and Synaptic Dysfunction When Expressed in Neurons of Caenorhabditis Elegans. *PLoS Genet* **2009**, *5*, e1000350, doi:10.1371/journal.pgen.1000350.
114. Ash, P.E.A.; Zhang, Y.-J.; Roberts, C.M.; Saldi, T.; Hutter, H.; Buratti, E.; Petrucelli, L.; Link, C.D. Neurotoxic Effects of TDP-43 Overexpression in C. Elegans. *Hum Mol Genet* **2010**, *19*, 3206–3218, doi:10.1093/hmg/ddq230.
115. Liachko, N.F.; Guthrie, C.R.; Kraemer, B.C. Phosphorylation Promotes Neurotoxicity in a *Caenorhabditis Elegans* Model of TDP-43 Proteinopathy. *The*

- Journal of Neuroscience* **2010**, *30*, 16208–16219,  
doi:10.1523/JNEUROSCI.2911-10.2010.
116. Vaccaro, A.; Tauffenberger, A.; Aggad, D.; Rouleau, G.; Drapeau, P.; Parker, J.A. Mutant TDP-43 and FUS Cause Age-Dependent Paralysis and Neurodegeneration in *C. Elegans*. *PLoS One* **2012**, *7*, e31321, doi:10.1371/journal.pone.0031321.
  117. Vaccaro, A.; Tauffenberger, A.; Ash, P.E.A.; Carlomagno, Y.; Petrucelli, L.; Parker, J.A. TDP-1/TDP-43 Regulates Stress Signaling and Age-Dependent Proteotoxicity in *Caenorhabditis Elegans*. *PLoS Genet* **2012**, *8*, e1002806, doi:10.1371/journal.pgen.1002806.
  118. Therrien, M.; Rouleau, G.A.; Dion, P.A.; Parker, J.A. Deletion of C9ORF72 Results in Motor Neuron Degeneration and Stress Sensitivity in *C. Elegans*. *PLoS One* **2013**, *8*, e83450, doi:10.1371/journal.pone.0083450.
  119. Brand, A.H.; Perrimon, N. Targeted Gene Expression as a Means of Altering Cell Fates and Generating Dominant Phenotypes. *Development* **1993**, *118*, 401–415, doi:10.1242/dev.118.2.401.
  120. Caygill, E.E.; Brand, A.H. The GAL4 System: A Versatile System for the Manipulation and Analysis of Gene Expression. In; 2016; pp. 33–52.
  121. Potter, C.J.; Tasic, B.; Russler, E. V.; Liang, L.; Luo, L. The Q System: A Repressible Binary System for Transgene Expression, Lineage Tracing, and Mosaic Analysis. *Cell* **2010**, *141*, 536–548, doi:10.1016/j.cell.2010.02.025.
  122. Lai, S.-L.; Lee, T. Genetic Mosaic with Dual Binary Transcriptional Systems in *Drosophila*. *Nat Neurosci* **2006**, *9*, 703–709, doi:10.1038/nn1681.
  123. Azuma, Y.; Mizuta, I.; Tokuda, T.; Mizuno, T. Amyotrophic Lateral Sclerosis Model. In; 2018; pp. 79–95.
  124. Watson, M.R.; Lagow, R.D.; Xu, K.; Zhang, B.; Bonini, N.M. A *Drosophila* Model for Amyotrophic Lateral Sclerosis Reveals Motor Neuron Damage by Human SOD1. *Journal of Biological Chemistry* **2008**, *283*, 24972–24981, doi:10.1074/jbc.M804817200.
  125. Elia, A.J.; Parkes, T.L.; Kirby, K.; St, P.; Boulianne, G.-H.L.; Phillips, J.P.; Hilliker, A.J. Expression of Human FALS SOD in Motorneurons of *Drosophila* 11A. J. Elia

- and T. L. Parkes Contributed Equally to This Work. *Free Radic Biol Med* **1999**, 26, 1332–1338, doi:10.1016/S0891-5849(98)00333-5.
126. Bahadorani, S.; Mukai, S.T.; Rabie, J.; Beckman, J.S.; Phillips, J.P.; Hilliker, A.J. Expression of Zinc-Deficient Human Superoxide Dismutase in *Drosophila* Neurons Produces a Locomotor Defect Linked to Mitochondrial Dysfunction. *Neurobiol Aging* **2013**, 34, 2322–2330, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2013.03.024.
  127. Steyaert, J.; Scheveneels, W.; Vanneste, J.; Van Damme, P.; Robberecht, W.; Callaerts, P.; Bogaert, E.; Van Den Bosch, L. FUS-Induced Neurotoxicity in *Drosophila* Is Prevented by Downregulating Nucleocytoplasmic Transport Proteins. *Hum Mol Genet* **2018**, doi:10.1093/hmg/ddy303.
  128. Fallini, C.; Khalil, B.; Smith, C.L.; Rossoll, W. Traffic Jam at the Nuclear Pore: All Roads Lead to Nucleocytoplasmic Transport Defects in ALS/FTD. *Neurobiol Dis* **2020**, 140, 104835, doi:10.1016/j.nbd.2020.104835.
  129. Kankel, M.W.; Sen, A.; Lu, L.; Theodorou, M.; Dimlich, D.N.; McCampbell, A.; Henderson, C.E.; Shneider, N.A.; Artavanis-Tsakonas, S. Amyotrophic Lateral Sclerosis Modifiers in *Drosophila* Reveal the Phospholipase D Pathway as a Potential Therapeutic Target. *Genetics* **2020**, 215, 747–766, doi:10.1534/genetics.119.302985.
  130. Menzies, F.M.; Fleming, A.; Caricasole, A.; Bento, C.F.; Andrews, S.P.; Ashkenazi, A.; Füllgrabe, J.; Jackson, A.; Jimenez Sanchez, M.; Karabiyik, C.; et al. Autophagy and Neurodegeneration: Pathogenic Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Neuron* **2017**, 93, 1015–1034, doi:10.1016/j.neuron.2017.01.022.
  131. Cheng, C.-W.; Lin, M.-J.; Shen, C.-K.J. Rapamycin Alleviates Pathogenesis of a New *Drosophila* Model of ALS-TDP. *J Neurogenet* **2015**, 29, 59–68, doi:10.3109/01677063.2015.1077832.
  132. Donde, A.; Sun, M.; Jeong, Y.H.; Wen, X.; Ling, J.; Lin, S.; Braunstein, K.; Nie, S.; Wang, S.; Chen, L.; et al. Upregulation of ATG7 Attenuates Motor Neuron Dysfunction Associated with Depletion of TARDBP/TDP-43. *Autophagy* **2020**, 16, 672–682, doi:10.1080/15548627.2019.1635379.

133. Khalil, B.; Cabirol-Pol, M.-J.; Miguel, L.; Whitworth, A.J.; Lecourtois, M.; Liévens, J.-C. Enhancing Mitofusin/Marf Ameliorates Neuromuscular Dysfunction in *Drosophila* Models of TDP-43 Proteinopathies. *Neurobiol Aging* **2017**, *54*, 71–83, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2017.02.016.
134. Babin, P.J.; Goizet, C.; Raldúa, D. Zebrafish Models of Human Motor Neuron Diseases: Advantages and Limitations. *Prog Neurobiol* **2014**, *118*, 36–58, doi:10.1016/j.pneurobio.2014.03.001.
135. Abugable, A.A.; Morris, J.L.M.; Palminha, N.M.; Zaksauskaite, R.; Ray, S.; El-Khamisy, S.F. DNA Repair and Neurological Disease: From Molecular Understanding to the Development of Diagnostics and Model Organisms. *DNA Repair (Amst)* **2019**, *81*, 102669, doi:10.1016/j.dnarep.2019.102669.
136. Morrice, J.; Gregory-Evans, C.; Shaw, C. Animal Models of Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Comparison of Model Validity. *Neural Regen Res* **2018**, *13*, 2050, doi:10.4103/1673-5374.241445.
137. Ramesh, T.; Lyon, A.N.; Pineda, R.H.; Wang, C.; Janssen, P.M.L.; Canan, B.D.; Burghes, A.H.M.; Beattie, C.E. A Genetic Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis in Zebrafish Displays Phenotypic Hallmarks of Motoneuron Disease. *Dis Model Mech* **2010**, *3*, 652–662, doi:10.1242/dmm.005538.
138. Parakh, S.; Shadfar, S.; Perri, E.R.; Ragagnin, A.M.G.; Piattoni, C. V.; Fogolín, M.B.; Yuan, K.C.; Shahheydari, H.; Don, E.K.; Thomas, C.J.; et al. The Redox Activity of Protein Disulfide Isomerase Inhibits ALS Phenotypes in Cellular and Zebrafish Models. *iScience* **2020**, *23*, 101097, doi:10.1016/j.isci.2020.101097.
139. Campanari, M.-L.; Marian, A.; Ciura, S.; Kabashi, E. TDP-43 Regulation of AChE Expression Can Mediate ALS-Like Phenotype in Zebrafish. *Cells* **2021**, *10*, 221, doi:10.3390/cells10020221.
140. De Giorgio, F.; Maduro, C.; Fisher, E.M.C.; Acevedo-Aroza, A. Transgenic and Physiological Mouse Models Give Insights into Different Aspects of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Dis Model Mech* **2019**, *12*, doi:10.1242/dmm.037424.
141. Rosen, D.R.; Siddique, T.; Patterson, D.; Figlewicz, D.A.; Sapp, P.; Hentati, A.; Donaldson, D.; Goto, J.; O'Regan, J.P.; Deng, H.-X.; et al. Mutations in Cu/Zn

- Superoxide Dismutase Gene Are Associated with Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Nature* **1993**, 362, 59–62, doi:10.1038/362059a0.
142. Gurney, M.E.; Pu, H.; Chiu, A.Y.; Dal Canto, M.C.; Polchow, C.Y.; Alexander, D.D.; Caliendo, J.; Hentati, A.; Kwon, Y.W.; Deng, H.-X.; et al. Motor Neuron Degeneration in Mice That Express a Human Cu,Zn Superoxide Dismutase Mutation. *Science (1979)* **1994**, 264, 1772–1775, doi:10.1126/science.8209258.
143. Volonté, C.; Apolloni, S.; Sabatelli, M. Histamine beyond Its Effects on Allergy: Potential Therapeutic Benefits for the Treatment of Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). *Pharmacol Ther* **2019**, 202, 120–131, doi:10.1016/j.pharmthera.2019.06.006.
144. Apolloni, S.; Caputi, F.; Pignataro, A.; Amadio, S.; Fabrizio, P.; Ammassari-Teule, M.; Volonté, C. Histamine Is an Inducer of the Heat Shock Response in SOD1-G93A Models of ALS. *Int J Mol Sci* **2019**, 20, 3793, doi:10.3390/ijms20153793.
145. Apolloni, S.; Amadio, S.; Fabrizio, P.; Morello, G.; Spampinato, A.G.; Latagliata, E.C.; Salvatori, I.; Proietti, D.; Ferri, A.; Madaro, L.; et al. Histaminergic Transmission Slows Progression of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* **2019**, 10, 872–893, doi:10.1002/jcsm.12422.
146. Fabrizio, P.; Apolloni, S.; Bianchi, A.; Salvatori, I.; Valle, C.; Lanzuolo, C.; Bendotti, C.; Nardo, G.; Volonté, C. P2X7 Activation Enhances Skeletal Muscle Metabolism and Regeneration in SOD1G93A Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Brain Pathology* **2020**, 30, 272–282, doi:10.1111/bpa.12774.
147. Volonté, C.; Amadio, S.; Fabrizio, P.; Apolloni, S. Functional Microglia Neurotransmitters in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Semin Cell Dev Biol* **2019**, 94, 121–128, doi:10.1016/j.semcdb.2019.04.014.
148. Proietti, D.; Giordani, L.; De Bardi, M.; D’Ercole, C.; Lozoska-Ochser, B.; Amadio, S.; Volonté, C.; Marinelli, S.; Muchir, A.; Bouché, M.; et al. Activation of Skeletal Muscle–Resident Glial Cells upon Nerve Injury. *JCI Insight* **2021**, 6, doi:10.1172/jci.insight.143469.
149. Lepore, E.; Casola, I.; Dobrowolny, G.; Musarò, A. Neuromuscular Junction as an Entity of Nerve-Muscle Communication. *Cells* **2019**, 8, 906, doi:10.3390/cells8080906.

150. Tang, J.; Kang, Y.; Zhou, Y.; Li, X.; Lan, J.; Wu, L.; Feng, X.; Peng, Y. ALS-Causing SOD1 Mutants Regulate Occludin Phosphorylation/Ubiquitination and Endocytic Trafficking via the ITCH/Eps15/Rab5 Axis. *Neurobiol Dis* **2021**, *153*, 105315, doi:10.1016/j.nbd.2021.105315.
151. Nijssen, J.; Comley, L.H.; Hedlund, E. Motor Neuron Vulnerability and Resistance in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Acta Neuropathol* **2017**, *133*, 863–885, doi:10.1007/s00401-017-1708-8.
152. Kim, G.; Gautier, O.; Tassoni-Tsuchida, E.; Ma, X.R.; Gitler, A.D. ALS Genetics: Gains, Losses, and Implications for Future Therapies. *Neuron* **2020**, *108*, 822–842, doi:10.1016/j.neuron.2020.08.022.
153. Gama Sosa, M.A.; De Gasperi, R.; Elder, G.A. Modeling Human Neurodegenerative Diseases in Transgenic Systems. *Hum Genet* **2012**, *131*, 535–563, doi:10.1007/s00439-011-1119-1.
154. Tokuda, E.; Okawa, E.; Watanabe, S.; Ono, S.; Marklund, S.L. Dysregulation of Intracellular Copper Homeostasis Is Common to Transgenic Mice Expressing Human Mutant Superoxide Dismutase-1s Regardless of Their Copper-Binding Abilities. *Neurobiol Dis* **2013**, *54*, 308–319, doi:10.1016/j.nbd.2013.01.001.
155. Fogarty, M.J.; Mu, E.W.H.; Noakes, P.G.; Lavidis, N.A.; Bellingham, M.C. Marked Changes in Dendritic Structure and Spine Density Precede Significant Neuronal Death in Vulnerable Cortical Pyramidal Neuron Populations in the SOD1G93A Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Acta Neuropathol Commun* **2016**, *4*, 77, doi:10.1186/s40478-016-0347-y.
156. Saba, L.; Viscomi, M.T.; Caioli, S.; Pignataro, A.; Bisicchia, E.; Pieri, M.; Molinari, M.; Ammassari-Teule, M.; Zona, C. Altered Functionality, Morphology, and Vesicular Glutamate Transporter Expression of Cortical Motor Neurons from a Presymptomatic Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Cerebral Cortex* **2016**, *26*, 1512–1528, doi:10.1093/cercor/bhu317.
157. Blair, I.P.; Williams, K.L.; Warraich, S.T.; Durnall, J.C.; Thoeng, A.D.; Manavis, J.; Blumbergs, P.C.; Vucic, S.; Kiernan, M.C.; Nicholson, G.A. FUS Mutations in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Clinical, Pathological, Neurophysiological and Genetic Analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **2010**, *81*, 639–645, doi:10.1136/jnnp.2009.194399.

158. Gois, A.M.; Mendonça, D.M.F.; Freire, M.A.M.; Santos, J.R. IN VITRO AND IN VIVO MODELS OF AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS: AN UPDATED OVERVIEW. *Brain Res Bull* **2020**, *159*, 32–43, doi:10.1016/j.brainresbull.2020.03.012.
159. Ling, S.-C.; Dastidar, S.G.; Tokunaga, S.; Ho, W.Y.; Lim, K.; Ilieva, H.; Parone, P.A.; Tyan, S.-H.; Tse, T.M.; Chang, J.-C.; et al. Overriding FUS Autoregulation in Mice Triggers Gain-of-Toxic Dysfunctions in RNA Metabolism and Autophagy-Lysosome Axis. *Elife* **2019**, *8*, doi:10.7554/eLife.40811.
160. Neumann, M.; Sampathu, D.M.; Kwong, L.K.; Truax, A.C.; Micsenyi, M.C.; Chou, T.T.; Bruce, J.; Schuck, T.; Grossman, M.; Clark, C.M.; et al. Ubiquitinated TDP-43 in Frontotemporal Lobar Degeneration and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Science (1979)* **2006**, *314*, 130–133, doi:10.1126/science.1134108.
161. Van Deerlin, V.M.; Leverenz, J.B.; Bekris, L.M.; Bird, T.D.; Yuan, W.; Elman, L.B.; Clay, D.; Wood, E.M.; Chen-Plotkin, A.S.; Martinez-Lage, M.; et al. TARDBP Mutations in Amyotrophic Lateral Sclerosis with TDP-43 Neuropathology: A Genetic and Histopathological Analysis. *Lancet Neurol* **2008**, *7*, 409–416, doi:10.1016/S1474-4422(08)70071-1.
162. Sreedharan, J.; Blair, I.P.; Tripathi, V.B.; Hu, X.; Vance, C.; Rogelj, B.; Ackerley, S.; Durnall, J.C.; Williams, K.L.; Buratti, E.; et al. TDP-43 Mutations in Familial and Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Science (1979)* **2008**, *319*, 1668–1672, doi:10.1126/science.1154584.
163. Smith, R.G.; Engelhardt, J.I.; Tajti, J.; Appel, S.H. Experimental Immune-Mediated Motor Neuron Diseases: Models for Human ALS. *Brain Res Bull* **1993**, *30*, 373–380, doi:10.1016/0361-9230(93)90268-G.
164. ENGELHARDT, J.I.; SIKLOS, L.; APPEL, S.H. Altered Calcium Homeostasis and Ultrastructure in Motoneurons of Mice Caused by Passively Transferred Anti-Motoneuronal IgG. *J Neuropathol Exp Neurol* **1997**, *56*, 21–39, doi:10.1097/00005072-199701000-00003.
165. Obál, I.; Nógrádi, B.; Meszlényi, V.; Patai, R.; Ricken, G.; Kovacs, G.G.; Tripolszki, K.; Széll, M.; Siklós, L.; Engelhardt, J.I. Experimental Motor Neuron Disease Induced in Mice with Long-Term Repeated Intraperitoneal Injections of Serum from ALS Patients. *Int J Mol Sci* **2019**, *20*, 2573, doi:10.3390/ijms20102573.

166. Nardone, R.; Höller, Y.; Taylor, A.C.; Lochner, P.; Tezzon, F.; Golaszewski, S.; Brigo, F.; Trinka, E. Canine Degenerative Myelopathy: A Model of Human Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Zoology* **2016**, *119*, 64–73, doi:10.1016/j.zool.2015.09.003.
167. Awano, T.; Johnson, G.S.; Wade, C.M.; Katz, M.L.; Johnson, G.C.; Taylor, J.F.; Perloski, M.; Biagi, T.; Baranowska, I.; Long, S.; et al. Genome-Wide Association Analysis Reveals a *SOD1* Mutation in Canine Degenerative Myelopathy That Resembles Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2009**, *106*, 2794–2799, doi:10.1073/pnas.0812297106.
168. Golubczyk, D.; Malysz-Cymborska, I.; Kalkowski, L.; Janowski, M.; Coates, J.R.; Wojtkiewicz, J.; Maksymowicz, W.; Walczak, P. The Role of Glia in Canine Degenerative Myelopathy: Relevance to Human Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Mol Neurobiol* **2019**, *56*, 5740–5748, doi:10.1007/s12035-019-1488-3.
169. Toedebusch, C.M.; Snyder, J.C.; Jones, M.R.; Garcia, V.B.; Johnson, G.C.; Villalón, E.L.; Coates, J.R.; Garcia, M.L. Arginase-1 Expressing Microglia in Close Proximity to Motor Neurons Were Increased Early in Disease Progression in Canine Degenerative Myelopathy, a Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Molecular and Cellular Neuroscience* **2018**, *88*, 148–157, doi:10.1016/j.mcn.2018.01.009.
170. Fernández-Trapero, M.; Espejo-Porras, F.; Rodríguez-Cueto, C.; Coates, J.R.; Pérez-Díaz, C.; de Lago, E.; Fernández-Ruiz, J. Up-Regulation of CB2 Receptors in Reactive Astrocytes in Canine Degenerative Myelopathy, a Disease Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Dis Model Mech* **2017**, doi:10.1242/dmm.028373.
171. Volonté, C.; Amadio, S.; Fabbrizio, P.; Apolloni, S. Functional Microglia Neurotransmitters in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Semin Cell Dev Biol* **2019**, *94*, 121–128, doi:10.1016/j.semcdb.2019.04.014.
172. Lewis, K.E.; Rasmussen, A.L.; Bennett, W.; King, A.; West, A.K.; Chung, R.S.; Chuah, M.I. Microglia and Motor Neurons during Disease Progression in the *SOD1G93A* Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis: Changes in Arginase1 and Inducible Nitric Oxide Synthase. *J Neuroinflammation* **2014**, *11*, 55, doi:10.1186/1742-2094-11-55.

173. Lee, Y.; Morrison, B.M.; Li, Y.; Lengacher, S.; Farah, M.H.; Hoffman, P.N.; Liu, Y.; Tsingalia, A.; Jin, L.; Zhang, P.-W.; et al. Oligodendroglia Metabolically Support Axons and Contribute to Neurodegeneration. *Nature* **2012**, *487*, 443–448, doi:10.1038/nature11314.
174. Verdier, J.-M.; Acquatella, I.; Lautier, C.; Devau, G.; Trouche, S.; Lasbleiz, C.; Mestre-Francés, N. Lessons from the Analysis of Nonhuman Primates for Understanding Human Aging and Neurodegenerative Diseases. *Front Neurosci* **2015**, *9*, doi:10.3389/fnins.2015.00064.
175. Herculano-Houzel, S.; Mota, B.; Wong, P.; Kaas, J.H. Connectivity-Driven White Matter Scaling and Folding in Primate Cerebral Cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2010**, *107*, 19008–19013, doi:10.1073/pnas.1012590107.
176. Mansfield, K. Marmoset Models Commonly Used in Biomedical Research. *Comp Med* **2003**, *53*, 383–392.
177. Sasaki, E.; Suemizu, H.; Shimada, A.; Hanazawa, K.; Oiwa, R.; Kamioka, M.; Tomioka, I.; Sotomaru, Y.; Hirakawa, R.; Eto, T.; et al. Generation of Transgenic Non-Human Primates with Germline Transmission. *Nature* **2009**, *459*, 523–527, doi:10.1038/nature08090.
178. Miller, C.T.; Freiwald, W.A.; Leopold, D.A.; Mitchell, J.F.; Silva, A.C.; Wang, X. Marmosets: A Neuroscientific Model of Human Social Behavior. *Neuron* **2016**, *90*, 219–233, doi:10.1016/j.neuron.2016.03.018.
179. Borel, F.; Gernoux, G.; Cardozo, B.; Metterville, J.P.; T. Cabrera, G.; Song, L.; Su, Q.; Gao, G.P.; Elmallah, M.K.; Brown, R.H.; et al. Therapeutic RAAVrh10 Mediated *SOD1* Silencing in Adult *SOD1*<sup>G93A</sup> Mice and Nonhuman Primates. *Hum Gene Ther* **2016**, *27*, 19–31, doi:10.1089/hum.2015.122.
180. Borel, F.; Gernoux, G.; Sun, H.; Stock, R.; Blackwood, M.; Brown, R.H.; Mueller, C. Safe and Effective Superoxide Dismutase 1 Silencing Using Artificial MicroRNA in Macaques. *Sci Transl Med* **2018**, *10*, doi:10.1126/scitranslmed.aau6414.
181. Uchida, A.; Sasaguri, H.; Kimura, N.; Tajiri, M.; Ohkubo, T.; Ono, F.; Sakaue, F.; Kanai, K.; Hirai, T.; Sano, T.; et al. Non-Human Primate Model of Amyotrophic

- Lateral Sclerosis with Cytoplasmic Mislocalization of TDP-43. *Brain* **2012**, *135*, 833–846, doi:10.1093/brain/awr348.
182. Benice, T.S.; Raber, J. Object Recognition Analysis in Mice Using Nose-Point Digital Video Tracking. *J Neurosci Methods* **2008**, *168*, 422–430, doi:10.1016/j.jneumeth.2007.11.002.
  183. Grossmann, M.; Skinner, M.H. A Simple Computer Based System to Analyze Morris Water Maze Trials On-Line. *J Neurosci Methods* **1996**, *70*, 171–175, doi:10.1016/S0165-0270(96)00115-X.
  184. Morris, R. Developments of a Water-Maze Procedure for Studying Spatial Learning in the Rat. *J Neurosci Methods* **1984**, *11*, 47–60, doi:10.1016/0165-0270(84)90007-4.
  185. Colomb, J.; Reiter, L.; Blaszkiewicz, J.; Wessnitzer, J.; Brembs, B. Open Source Tracking and Analysis of Adult Drosophila Locomotion in Buridan's Paradigm with and without Visual Targets. *PLoS One* **2012**, *7*, e42247, doi:10.1371/journal.pone.0042247.
  186. Gomez-Marin, A.; Partoune, N.; Stephens, G.J.; Louis, M. Automated Tracking of Animal Posture and Movement during Exploration and Sensory Orientation Behaviors. *PLoS One* **2012**, *7*, e41642, doi:10.1371/journal.pone.0041642.
  187. Patel, T.P.; Gullotti, D.M.; Hernandez, P.; O'Brien, W.T.; Capehart, B.P.; Morrison, B.; Bass, C.; Eberwine, J.E.; Abel, T.; Meaney, D.F. An Open-Source Toolbox for Automated Phenotyping of Mice in Behavioral Tasks. *Front Behav Neurosci* **2014**, *8*, doi:10.3389/fnbeh.2014.00349.
  188. Scaplen, K.M.; Mei, N.J.; Bounds, H.A.; Song, S.L.; Azanchi, R.; Kaun, K.R. Automated Real-Time Quantification of Group Locomotor Activity in *Drosophila Melanogaster*. *Sci Rep* **2019**, *9*, 4427, doi:10.1038/s41598-019-40952-5.
  189. Egnor, S.E.R.; Branson, K. Computational Analysis of Behavior. *Annu Rev Neurosci* **2016**, *39*, 217–236, doi:10.1146/annurev-neuro-070815-013845.
  190. Valletta, J.J.; Torney, C.; Kings, M.; Thornton, A.; Madden, J. Applications of Machine Learning in Animal Behaviour Studies. *Anim Behav* **2017**, *124*, 203–220, doi:10.1016/j.anbehav.2016.12.005.

191. Robie, A.A.; Seagraves, K.M.; Egnor, S.E.R.; Branson, K. Machine Vision Methods for Analyzing Social Interactions. *Journal of Experimental Biology* **2017**, *220*, 25–34, doi:10.1242/jeb.142281.
192. Amorim, F.E.; Moulin, T.C.; Amaral, O.B. A Freely Available, Self-Calibrating Software for Automatic Measurement of Freezing Behavior. *Front Behav Neurosci* **2019**, *13*, doi:10.3389/fnbeh.2019.00205.
193. Geuther, B.Q.; Deats, S.P.; Fox, K.J.; Murray, S.A.; Braun, R.E.; White, J.K.; Chesler, E.J.; Lutz, C.M.; Kumar, V. Robust Mouse Tracking in Complex Environments Using Neural Networks. *Commun Biol* **2019**, *2*, 124, doi:10.1038/s42003-019-0362-1.
194. Kabra, M.; Robie, A.A.; Rivera-Alba, M.; Branson, S.; Branson, K. JAABA: Interactive Machine Learning for Automatic Annotation of Animal Behavior. *Nat Methods* **2013**, *10*, 64–67, doi:10.1038/nmeth.2281.
195. Qiao, B.; Li, C.; Allen, V.W.; Shirasu-Hiza, M.; Syed, S. Automated Analysis of Long-Term Grooming Behavior in *Drosophila* Using a k-Nearest Neighbors Classifier. *Elife* **2018**, *7*, doi:10.7554/eLife.34497.
196. van den Boom, B.J.G.; Pavlidi, P.; Wolf, C.J.H.; Mooij, A.H.; Willuhn, I. Automated Classification of Self-Grooming in Mice Using Open-Source Software. *J Neurosci Methods* **2017**, *289*, 48–56, doi:10.1016/j.jneumeth.2017.05.026.
197. Burkett, Z.D.; Day, N.F.; Peñagarikano, O.; Geschwind, D.H.; White, S.A. VoICE: A Semi-Automated Pipeline for Standardizing Vocal Analysis across Models. *Sci Rep* **2015**, *5*, 10237, doi:10.1038/srep10237.
198. Arac, A.; Zhao, P.; Dobkin, B.H.; Carmichael, S.T.; Golshani, P. DeepBehavior: A Deep Learning Toolbox for Automated Analysis of Animal and Human Behavior Imaging Data. *Front Syst Neurosci* **2019**, *13*, doi:10.3389/fnsys.2019.00020.
199. Marques, J.C.; Lackner, S.; Félix, R.; Orger, M.B. Structure of the Zebrafish Locomotor Repertoire Revealed with Unsupervised Behavioral Clustering. *Current Biology* **2018**, *28*, 181-195.e5, doi:10.1016/j.cub.2017.12.002.
200. Berman, G.J.; Choi, D.M.; Bialek, W.; Shaevitz, J.W. Mapping the Stereotyped Behaviour of Freely Moving Fruit Flies. *J R Soc Interface* **2014**, *11*, 20140672, doi:10.1098/rsif.2014.0672.

201. Klibaite, U.; Berman, G.J.; Cande, J.; Stern, D.L.; Shaevitz, J.W. An Unsupervised Method for Quantifying the Behavior of Paired Animals. *Phys Biol* **2017**, *14*, 015006, doi:10.1088/1478-3975/aa5c50.
202. Wiltchko, A.B.; Johnson, M.J.; Iurilli, G.; Peterson, R.E.; Katon, J.M.; Pashkovski, S.L.; Abraira, V.E.; Adams, R.P.; Datta, S.R. Mapping Sub-Second Structure in Mouse Behavior. *Neuron* **2015**, *88*, 1121–1135, doi:10.1016/j.neuron.2015.11.031.
203. Pérez-Escudero, A.; Vicente-Page, J.; Hinz, R.C.; Arganda, S.; de Polavieja, G.G. IdTracker: Tracking Individuals in a Group by Automatic Identification of Unmarked Animals. *Nat Methods* **2014**, *11*, 743–748, doi:10.1038/nmeth.2994.
204. Romero-Ferrero, F.; Bergomi, M.G.; Hinz, R.C.; Heras, F.J.H.; de Polavieja, G.G. Idtracker.Ai: Tracking All Individuals in Small or Large Collectives of Unmarked Animals. *Nat Methods* **2019**, *16*, 179–182, doi:10.1038/s41592-018-0295-5.
205. Katsov, A.Y.; Freifeld, L.; Horowitz, M.; Kuehn, S.; Clandinin, T.R. Dynamic Structure of Locomotor Behavior in Walking Fruit Flies. *Elife* **2017**, *6*, doi:10.7554/eLife.26410.
206. Vogelstein, J.T.; Park, Y.; Ohyama, T.; Kerr, R.A.; Truman, J.W.; Priebe, C.E.; Zlatic, M. Discovery of Brainwide Neural-Behavioral Maps via Multiscale Unsupervised Structure Learning. *Science (1979)* **2014**, *344*, 386–392, doi:10.1126/science.1250298.
207. Torazza, C.; Provenzano, F.; Gallia, E.; Cerminara, M.; Balbi, M.; Bonifacino, T.; Tessitore, S.; Ravera, S.; Usai, C.; Musante, I.; et al. Genetic Downregulation of the Metabotropic Glutamate Receptor Type 5 Dampens the Reactive and Neurotoxic Phenotype of Adult ALS Astrocytes. *Cells* **2023**, *12*, 1952, doi:10.3390/cells12151952.
208. Stifanese, R.; Aversa, M.; De Tullio, R.; Pedrazzi, M.; Milanese, M.; Bonifacino, T.; Bonanno, G.; Salamino, F.; Pontremoli, S.; Melloni, E. Role of Calpain-1 in the Early Phase of Experimental ALS. *Arch Biochem Biophys* **2014**, *562*, 1–8, doi:10.1016/j.abb.2014.08.006.
209. Raffaele, S.; Nguyen, N.; Milanese, M.; Mannella, F.C.; Boccazzi, M.; Frumento, G.; Bonanno, G.; Abbracchio, M.P.; Bonifacino, T.; Fumagalli, M. Montelukast Improves Disease Outcome in SOD1<sup>G93A</sup> Female Mice by Counteracting

- Oligodendrocyte Dysfunction and Aberrant Glial Reactivity. *Br J Pharmacol* **2024**, *181*, 3303–3326, doi:10.1111/bph.16408.
210. Preisig, D.F.; Kulic, L.; Krüger, M.; Wirth, F.; McAfoose, J.; Späni, C.; Gantenbein, P.; Derungs, R.; Nitsch, R.M.; Welt, T. High-Speed Video Gait Analysis Reveals Early and Characteristic Locomotor Phenotypes in Mouse Models of Neurodegenerative Movement Disorders. *Behavioural Brain Research* **2016**, *311*, 340–353, doi:10.1016/j.bbr.2016.04.044.
211. Gould, T.W.; Buss, R.R.; Vinsant, S.; Prevette, D.; Sun, W.; Knudson, C.M.; Milligan, C.E.; Oppenheim, R.W. Complete Dissociation of Motor Neuron Death from Motor Dysfunction by Bax Deletion in a Mouse Model of ALS. *The Journal of Neuroscience* **2006**, *26*, 8774–8786, doi:10.1523/JNEUROSCI.2315-06.2006.
212. Hegedus, J.; Putman, C.T.; Gordon, T. Time Course of Preferential Motor Unit Loss in the SOD1G93A Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurobiol Dis* **2007**, *28*, 154–164, doi:10.1016/j.nbd.2007.07.003.
213. Wei, Q.-Q.; Guo, Y.; Li, S.; Yang, T.; Hou, Y.; Ou, R.; Lin, J.; Jiang, Q.; Shang, H. Prevalence and Associated Factors of Apathy in Chinese ALS Patients. *Front Psychol* **2023**, *14*, doi:10.3389/fpsyg.2023.1089856.
214. Kutlubaev, M.A.; Caga, J.; Xu, Y.; Areprintseva, D.K.; Pervushina, E. V.; Kiernan, M.C. Apathy in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Systematic Review and Meta-Analysis of Frequency, Correlates, and Outcomes. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* **2023**, *24*, 14–23, doi:10.1080/21678421.2022.2053721.
215. Abrahams, S. Neuropsychological Impairment in Amyotrophic Lateral Sclerosis–Frontotemporal Spectrum Disorder. *Nat Rev Neurol* **2023**, *19*, 655–667, doi:10.1038/s41582-023-00878-z.
216. Caga, J.; Hsieh, S.; Highton-Williamson, E.; Zoing, M.C.; Ramsey, E.; Devenney, E.; Ahmed, R.M.; Kiernan, M.C. Apathy and Its Impact on Patient Outcome in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Neurol* **2018**, *265*, 187–193, doi:10.1007/s00415-017-8688-4.
217. Sturman, O.; Germain, P.-L.; Bohacek, J. Exploratory Rearing: A Context- and Stress-Sensitive Behavior Recorded in the Open-Field Test. *Stress* **2018**, *21*, 443–452, doi:10.1080/10253890.2018.1438405.

218. Janus, C.; Koperwas, J.S.; Janus, M.; Roder, J. Rearing Environment and Radial Maze Exploration in Mice. *Behavioural Processes* **1995**, *34*, 129–140, doi:10.1016/0376-6357(94)00060-T.
219. Wexler, Y.; Benjamini, Y.; Golani, I. Vertical Exploration and Dimensional Modularity in Mice. *R Soc Open Sci* **2018**, *5*, 180069, doi:10.1098/rsos.180069.
220. Klenowski, P.M.; Zhao-Shea, R.; Freels, T.G.; Molas, S.; Zinter, M.; M'Angale, P.; Xiao, C.; Martinez-Núñez, L.; Thomson, T.; Tapper, A.R. A Neuronal Coping Mechanism Linking Stress-Induced Anxiety to Motivation for Reward. *Sci Adv* **2023**, *9*, doi:10.1126/sciadv.adh9620.
221. Rojas-Carvajal, M.; Brenes, J.C. Acute Stress Differentially Affects Grooming Subtypes and Ultrasonic Vocalisations in the Open-Field and Home-Cage Test in Rats. *Behavioural Processes* **2020**, *176*, 104140, doi:10.1016/j.beproc.2020.104140.
222. Xie, Z.; Li, D.; Cheng, X.; Pei, Q.; Gu, H.; Tao, T.; Huang, M.; Shang, C.; Geng, D.; Zhao, M.; et al. A Brain-to-Spinal Sensorimotor Loop for Repetitive Self-Grooming. *Neuron* **2022**, *110*, 874-890.e7, doi:10.1016/j.neuron.2021.11.028.

## **RINGRAZIAMENTI**

Vorrei ringraziare tutte le persone che mi hanno accompagnata in questo percorso e che, con il loro sostegno, hanno reso possibile il raggiungimento di questo traguardo.

Un grazie speciale a mia madre, per i suoi sacrifici, la pazienza e il supporto costante in ogni momento. Senza di lei, nulla di tutto questo sarebbe stato possibile.

Un sentito ringraziamento ai miei compagni di università in particolare Simone, Alessia A., Alessia C., Alessia O., Asia, che hanno condiviso con me risate, difficoltà e lunghe ore di studio. Il vostro supporto e la vostra amicizia hanno reso questo percorso più ricco e leggero.

Grazie al mio relatore Massimo Grilli per la guida preziosa, i consigli e la fiducia che mi ha accordato lungo il percorso di tesi.

Infine, un ringraziamento alle dottorande Martina e Hanna con cui ho avuto il piacere di condividere il periodo di tesi. La loro esperienza, il loro aiuto e i loro suggerimenti sono stati di grande valore per la mia crescita accademica.

A tutti voi, la mia più profonda riconoscenza.