

**Estudio ProtALS:  
análisis proteómico en tejido  
postmortem de sujetos con  
esclerosis lateral amiotrófica (ELA).  
Búsqueda de biomarcadores y  
dianas terapéuticas**

---

Memoria presentada por  
**Marina Oaia Iridoy Zulet**

---

Para optar al grado de doctor por la Universidad Pública de Navarra

<https://doi.org/10.48035/Tesis/2454/41082>



**Los Dres. Ivonne Jericó y Joaquín Fernández-Irigoyen informan que la presente memoria de tesis doctoral elaborada por Marina Oaia Iridoy Zulet ha sido realizada bajo su dirección y cumple con las condiciones exigidas por la legislación vigente para optar al grado de Doctor.**

**Y para que así conste, firman la presente en Pamplona, a 9 de marzo del 2020.**

## AGRADECIMIENTOS

No es fácil resumir en unas líneas lo agradecida que estoy a todas las personas que de una u otra manera han hecho que esta tesis doctoral sea una realidad.

En primer lugar, me gustaría darles las gracias a mis directores de tesis, la Dra. Ivonne Jericó y el Dr. Joaquin Fernandez, por depositar su confianza en mí. Sobre todo, agradecerles que me dieran esta oportunidad, así como su constante disponibilidad y apoyo durante estos años.

Esta tesis surge gracias a la recaudación de fondos liderada por ADELA (Asociación de Esclerosis Lateral Amiotrófica de Navarra), que nos brindó la financiación necesaria para poner en marcha este proyecto. Quiero agradecer también al centro de investigación Navarrabiomed y a la Universidad Pública de Navarra por haberme permitido disponer de los recursos y medios necesarios para realizar mi tesis doctoral. Así mismo, mi agradecimiento a Iñaki Encío por su tiempo dedicado.

A mis padres, por su paciencia y apoyo incondicional. Gracias por brindarme la mejor educación posible, por enseñarme a perseguir mis sueños y a valorar el esfuerzo del trabajo bien realizado. No puedo olvidarme tampoco de esos tupperts que me han salvado tantas comidas y de las innumerables horas de juego cuidando a Markel. Sin vosotros esta tesis no sería posible.

A mi hermana Amaia, quiero agradecerle sus sabios consejos de hermana mayor, siempre tan acertados, pero, sobre todo, gracias por esos momentos de risas y felicidad después de largas horas de estudio y trabajo. No te puedes imaginar qué importantes han sido esos momentos para mí, dándome la energía y el ánimo que necesitaba cuando me flaqueaban las fuerzas.

Y, por supuesto, no puedo olvidar a los dos amores de mi vida, Iñaki y Markel, gracias por estar siempre ahí, sin excepción. Iñaki, gracias por tu paciencia infinita con mis habilidades con Office y la informática en general, por esas largas noches de desvelo junto a Markel y por esa tortilla de patatas que alegra el día a cualquiera.

## Contenido

1	INTRODUCCIÓN.....	3
1.1	ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA (ELA) .....	3
1.1.A	EPIDEMIOLOGÍA ELA .....	3
1.1.B	ETIOLOGÍA ELA.....	5
1.1.C	GENÉTICA ELA.....	5
1.1.D	CLÍNICA ELA .....	8
1.1.E	DIAGNÓSTICO ELA.....	11
1.1.F	DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL.....	13
1.1.G	ANATOMÍA PATOLÓGICA ELA.....	15
1.1.H	PATOGENIA ELA .....	18
1.1.I	TRATAMIENTO ELA .....	21
1.1.J	BIOMARCADORES ELA .....	25
1.2	ELA Y DEMENCIA FRONTOTEMPORAL (DFT).....	32
1.2.A	CLÍNICA ELA/DFT.....	33
1.2.B	NEUROPATOLOGÍA ELA/DFT .....	33
1.2.C	GENÉTICA ELA/DFT .....	34
1.3	PROTEÓMICA .....	35
1.3.A	INTRODUCCIÓN .....	35
1.3.B	NEUROPROTEÓMICA .....	36
1.3.C	NEUROPROTEÓMICA TISULAR EN ELA.....	37
2	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	40
3	MATERIAL Y MÉTODOS.....	42
3.1	SELECCIÓN DE PACIENTES Y CONTROLES .....	42
3.2	PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.....	44
3.2.A	ANÁLISIS NEUROPATOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICO .....	44
3.2.B	EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS A PARTIR DE TEJIDO NEUROLÓGICO .....	46
3.2.C	ANÁLISIS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS .....	46
3.2.D	ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS .....	47
3.2.E	ANÁLISIS DE INMUNODETECCIÓN (WESTERN-BLOT) .....	48
3.3	ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO EN SUERO .....	50

4	RESULTADOS.....	51
4.1	DESEQUILIBRIO PROTEOSTÁTICO EN MÉDULA ESPINAL DE SUJETOS CON ELA Y DLFT-U	51
4.2	PERFIL NEUROANATÓMICO DE LA ELA Y DLFT-U: ESPECIFICIDADES DE CADA REGIÓN Y ENFERMEDAD. ....	55
4.2.A	REGULACIÓN ESPECÍFICA POR REGIÓN Y ENFERMEDAD: LGALS2 y SELENBP1...57	
4.2.B	REGULACIÓN ESPECÍFICA POR ENFERMEDAD EN ELA: TTR, S100A6, S100A11, PIN1	57
4.2.C	SIN REGULACIÓN ESPECÍFICA POR REGIÓN NI ENFERMEDAD: CACYBP, ROCK2 Y NAGK.	57
4.3	REDES DE INTERACCIÓN: VÍAS METABÓLICAS INVOLUCRADAS EN LAS ALTERACIONES PROTEÓMICAS OBSERVADAS EN ELA Y DLFT-U.....	59
4.4	COMPLEJO PROHIBITINA (PHB) COMO SENSOR DE ALTERACIÓN MITOCONDRIAL DE MANERA DIFERENCIADA EN ELA Y DLFT-U.....	62
4.5	RESULTADO ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO EN SUERO PARA LAS PROTEÍNAS SELENBP1 Y NAGK.....	63
5	DISCUSIÓN.....	65
5.1	RASGOS FISIOPATOLÓGICOS COMUNES ENTRE LA ELA Y DLFT-U.....	65
5.2	BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES DE ELA.....	66
5.2.A	PROTEÍNAS CON REGULACIÓN ESPECÍFICA POR REGIÓN Y ENFERMEDAD: LGALS3 Y SELENBP1.....	68
5.2.B	PROTEÍNAS CON REGULACIÓN ESPECÍFICA POR ENFERMEDAD: TTR, S100A6, S100A11 Y PIN1.....	69
5.2.C	PROTEÍNAS SIN REGULACIÓN ESPECÍFICA POR REGIÓN O ENFERMEDAD: CACYBP, ROCK2 Y NAGK.....	71
5.3	INTERACTOMAS DE PROTEÍNAS.....	73
5.3.A	CONTRIBUCIÓN DE LAS PROTEÍNAS CINASAS EN LA MUERTE CELULAR.....	73
5.3.B	COMPLEJO PROHIBITINA COMO SENSOR DE ALTERACIÓN MITOCONDRIAL.....	75
6	CONCLUSIONES.....	76
7	ABREVIATURAS.....	77
8	BIBLIOGRAFÍA.....	78

## 1.1 ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA (ELA)

La ELA es la forma más frecuente de enfermedad progresiva de neurona motora. Consiste en una enfermedad neurodegenerativa que se origina como resultado de la degeneración combinada de las neuronas motoras superiores e inferiores de la médula espinal y de la corteza motora, que se sigue de un curso fatal, con una mediana de supervivencia inferior a cinco años (Robert H.Brown, NEngl J Med, 2017). Fue Jean Martin Charcot en 1865 quien describió por primera esta enfermedad heterogénea desde el punto de vista clínico y patológico (Charcot JM, L'UnionMed, 1865).

### 1.1.A EPIDEMIOLOGÍA ELA

La incidencia de la ELA en Europa y Estados Unidos (EEUU) es de 1,7-2,2 casos por 100.000 habitantes/año y la prevalencia es de 3-5 casos por 100.000 habitantes/año (Oskarsson B, Mayo ClinProc, 2018) (Chio A, Neuroepidemiology, 2013). En Asia Oriental se ha medido una incidencia algo más baja con 0,89 casos por 100.000 habitantes/año, a excepción de determinados enclaves geográficos endémicos, como la isla de Guam, donde se llegó a registrar una incidencia de 22 casos por 100.000 habitantes/año en 1989 (Waring SC, Neuroepidemiology, 2004). La mayor parte de África, América Latina y Oceanía no disponen de estudios poblacionales (Logroscino G, Neuroepidemiology, 2019). La ELA afecta a individuos de ambos sexos con ligero predominio en hombres (1,7/1) y aunque puede manifestarse a cualquier edad, es raro que debute antes de la tercera década, siendo la edad de presentación más frecuente entre los 45 y 65 años (Logroscino G, J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2010). Tanto la incidencia como la prevalencia de la ELA aumentan con la edad, y en Europa y EEUU se estima un riesgo acumulado de padecer ELA a lo largo de la vida de 1 por 400 (Robert H.Brown, NEngl J Med, 2017).

Las curvas de supervivencia de los pacientes con ELA se encuentran muy sesgadas, con un amplio rango desde el inicio de los síntomas. (Pradas J, Amyotroph Lat Scler Fontotemporal Degener, 2013). La esperanza de vida media es de 3 a 5 años, con una variación considerable, habiéndose observado hasta un 10% de pacientes con una supervivencia superior a 10 años (Paipa AJ, J Multidiscip Healthc, 2019). Se han descrito diferentes factores que parecen estar implicados en la supervivencia:

**1- Edad de inicio:** La supervivencia es mayor en el debut más precoz de la enfermedad (Eisen A, MuscleNerve ,1993).

**2- Localización de los síntomas:** La ELA es una enfermedad con una presentación clínica heterogénea. Los diferentes fenotipos de la enfermedad difieren en la progresión y tiempo de supervivencia. Se ha observado que cuando los síntomas aparecen en una extremidad la supervivencia media es mayor que si los síntomas de inicio son bulbares, si bien es cierto que estas estimaciones no siempre tienen en cuenta los avances recientes en el manejo ventilatorio (Wolf J, J Neurol Sci, 2014).

**3- Intervención médica:** La disponibilidad hoy en día de tratamientos más agresivos como el soporte ventilatorio para el fallo respiratorio (ventilación no-invasiva) y el soporte nutricional para la disfagia (sonda nasogástrica y gastrostomía endoscópica percutánea) se ha traducido en un aumento de supervivencia (O'Brien D, Eur Respir J, 2019) (Burkhardt C, PLoS One, 2017). Existe evidencia de que una atención multidisciplinar mejora la supervivencia y calidad de vida de estos pacientes (Paipa AJ, J Multidiscip Healthc, 2019). El Riluzole es el único fármaco aprobado en España que puede prolongar la esperanza de vida en pacientes con ELA. En el ensayo original, riluzole prolongó la supervivencia media en aproximadamente tres meses, pero no se observó ningún efecto sobre la funcionalidad del paciente, por lo que se desconoce si el beneficio se produce en una etapa temprana, tardía o si se propaga a lo largo del curso de la enfermedad (Adriaan D de Jongh, J NeurolNeurosurgPsychiatry, 2019).

**4- Índice de masa corporal y dieta:** Un índice de masa corporal (IMC) bajo al diagnóstico y una disminución rápida del peso corporal en las primeras etapas de la enfermedad (pérdida de más de 5% del peso premórbido), predicen un tiempo de supervivencia más corto o una necesidad más temprana de traqueotomía (Nakayama Y, Sci Rep, 2019). Sin embargo, una revisión sistemática, realizada por Kellogg, muestra que hay una falta de evidencia de alta calidad con respecto a la eficacia de la intervención en la dieta para ralentizar la progresión de la enfermedad (Kellogg J, Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener, 2018).

**5- Factores ambientales:** Aunque se han buscado factores ambientales que modifiquen la incidencia o la evolución de la enfermedad, no se ha encontrado ninguno significativo (Lian L, J ClinNeurosci, 2019).



## 1.1.B ETIOLOGÍA ELA

El 5-15% de los casos de ELA son familiares, de herencia genéticamente heterogénea, y el 85-95% de los casos de ELA son esporádicos, de etiopatogenia desconocida.

Se han estudiado múltiples agentes ambientales que puedan desencadenar la enfermedad. Existen estudios que han intentado relacionar esta enfermedad con metales pesados (plomo, hierro, cadmio, selenio y mercurio), neurotóxicos (insecticidas), tabaco, ejercicio físico intenso, militares de la Guerra del Golfo Pérsico, estrés físico y emocional, índice de masa corporal, y exposición a campos electromagnéticos, sin llegar a ninguna conclusión significativa (Natalia Nowicka, Int J Mol Sci, 2019).

Tampoco los estudios de las poblaciones de algunos enclaves geográficos endémicos para la ELA (isla de Guam o península de Kii), con una incidencia muy superior a la observada en Europa o EEUU, han permitido identificar agentes externos etiológicos, aunque si se han propuesto algunos tales como alteraciones en el metabolismo del colágeno de la piel de pacientes de la península de Kii con ELA (Tsukie T, Acta Neurol Taiwan, 2014) o la contaminación de los suministros de alimentos tradicionales del pueblo Chamorro de Guam con la toxina cianobacteriana/BMAA (Banack SA, Neurotox Res, 2018).

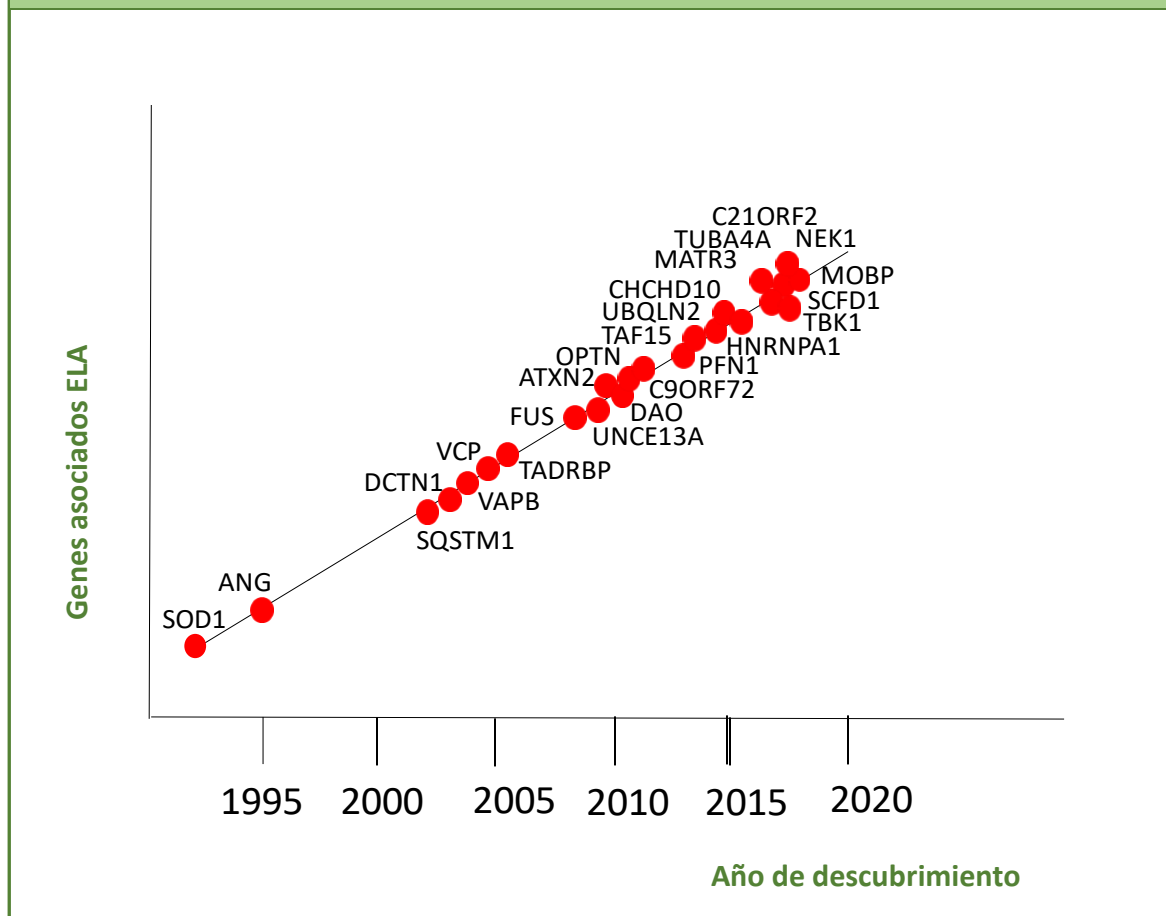
Estos resultados apuntan a que son los factores de predisposición genética los que influyen más en su desarrollo.

## 1.1.C GENÉTICA ELA

La ELA se trata de un síndrome complejo donde un 5-15% de los casos son familiares, genéticamente heterogéneos (Dekker AM, SciRep, 2019). La herencia puede variar entre patrones autosómico dominante (AD), autosómico recesivo (AR) y ligado al cromosoma X (ligX). Gracias a las nuevas tecnologías, como el mapeo y la secuenciación de exomas, el componente genético está cobrando cada vez mayor importancia tanto en la ELA familiar (ELAf) como en la ELA esporádica (ELAe).

En la actualidad son más de 25, los genes que se han visto asociados a la enfermedad (ALSoddatabase, disponible en: <http://alsod.iop.kel.ac.uk/>), pero, hay cinco genes principales, identificados como causas definitivas de ELA, que son: SOD1, C9orf72, TARDBP, FUS y TBK1.

Figura 1: Genes asociados a la ELA según año de descubrimiento.



**1-SOD1:** El gen de la superóxido dismutasa 1 Zn/Cu (SOD1) localizado en el cromosoma 21q22, fue el primer gen asociado con la aparición de la enfermedad y se identificó en 1993 (Rosen DR, Nature, 1993). Representa el 20% de todos los casos de ELAf y el 3% de los casos de ELAe. Se han descrito más de 100 mutaciones asociadas a dicho gen y la mayoría de ellas son mutaciones puntuales de cambio aminoacídico. La herencia es autosómica dominante, aunque en Suecia y Finlandia se han confirmado patrones de herencia recesiva de la enfermedad (Zou ZY, J NeurolNeurosurgPsychiatry, 2017).

**2-TARDBP:** En 2006, tras el descubrimiento del depósito de proteína TDP43 en la ELA, se identificaron mutaciones en el gen TARDBP que la codifica. Se transmite por herencia autosómica dominante, se localiza en el cromosoma 1q36.22 y se encuentra en el 4% de las ELAf y en el 1% de las ELAe (Natalia Nowicka, Int J Mol Sci, 2019). La TDP43 es una proteína de la familia de las ribonucleoproteínas, que se encuentra predominantemente en el núcleo, y que interacciona con las moléculas de ADN y ARN, interviniendo en la transcripción, “splicing” y posterior transporte de los ARN.

En situaciones de estrés, TDP43 se encuentra predominantemente en el citoplasma, formando agregados citoplasmáticos. Este gen fue uno de los primeros descritos como causales de las enfermedades neurodegenerativas incluidas en el espectro ELA/Demencia Frontotemporal (DFT) (Caroppo P, NeurolGenet, 2016).

**3-FUS-TLS:** En 2009 se identificó esta mutación localizada en el cromosoma 16q12,1-12,2, que se transmite por herencia autosómica dominante y que está presente en el 3% de las ELAf y en el 0,3% de las ELAe (Vance C, Science, 2009). Al igual que la TDP43, FUS es una proteína de unión al ARN, también llamadas RBP (RNA Binding Proteins), las cuales están involucradas en múltiples procesos como estabilidad y transporte del ARNm, función mitocondrial y autofagia (Birsa N, SeminCellDevBiol, 2019).

**4-C9orf72:** La mutación más frecuente en la ELA en Europa, identificada en 2011, es la expansión del hexanucleótido GGGGCC en la región no codificante del gen C9orf72 localizado en el cromosoma 9q21-22. Se transmite por herencia autosómica dominante, codifica una proteína todavía no caracterizada y está presente en el 20-51% de las ELAf y el 5-10% de las ELAe (Garcia-Redondo A, HumMutat, 2013). Esta es, también, la mutación más frecuente en la Demencia Frontotemporal Ubiquitin positiva (DFT-U), representando un 20% de los casos de DFT familiar (Marogianni C, NeurobiolAging, 2019), si bien es cierto que no es la única alteración genética que comparten ambas enfermedades ya que se han descrito mutaciones en múltiples genes como SQSTM1, TARDBP, TBK1 y CHCHD10 (Karch CM, JAMA Neurol, 2018).

**5-TBK1:** Recientemente se ha descrito la asociación entre la mutación del gen que codifica la quinasa de unión al TANK1, con la ELA y la DFT (Cui R, NeurolSci, 2018). Esta proteína fosforila una amplia gama de sustratos y ejerce control sobre varios procesos clave a nivel celular como son la respuesta inmune innata, la inflamación, la proliferación celular y la autofagia. Además, interactúa con optineurin (OPTN), descrito previamente como gen relacionado con la ELA (Liu Z, FrontImmunol, 2018). Se han descrito diversas mutaciones patogénicas en múltiples cohortes y su frecuencia en ellas varía entre el 1-4% de los casos de ELA con o sin DFT.

En base a las funciones de muchos de los genes asociadas a la ELA, hay cada vez más evidencias de que una alteración en el metabolismo del ARN es clave en la patogénesis de la enfermedad. El metabolismo normal del ARN dirige la síntesis de proteínas hacia



**Estudio protALS: Análisis proteómico en tejido postmortem de sujetos con Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA). Búsqueda de biomarcadores y dianas terapéuticas.**

Autora: Marina Oaia Iridoy Zulet

los sitios donde son necesarias, para lo cual requiere del transporte de ARN mensajero (ARNm) relacionado con complejos de ribonucleoproteínas (llamados gránulos de ARN) en el sitio de la síntesis de la proteína naciente. Este mecanismo permite a la célula expresar los genes cuyos productos tienen una relación funcional en tiempo y espacio.

El principal desafío al que nos enfrentamos en estos momentos, en la investigación genética, se centra en cómo interpretar los resultados obtenidos de la secuenciación de exomas, ya que la identificación de una variante poco frecuente en un gen de un paciente con ELA, no es en sí misma una fuerte evidencia de relevancia específica para la enfermedad.

Además, la cantidad de heredabilidad explicada por la información genética obtenida por microarrays de todo el genoma es del aproximadamente 12%, lo que implica también la participación de otras alteraciones como la variación del número de copias, las repeticiones de microsatélites o los cambios epigenéticos (Sarah Martin, F1000Res, 2017).

### 1.1.D CLÍNICA ELA

Los síntomas y signos de la ELA derivan de la degeneración progresiva de neuronas motoras (también llamadas motoneuronas) superior e inferior a distintos niveles, como córtex motor y asta anterior de la médula. La afectación dual de motoneurona superior e inferior, en ausencia de signos de afectación de otras estructuras del sistema nervioso, sentarán el pilar diagnóstico de la enfermedad (Raymond J, Amyotroph Lateral SclerFrontotemporalDegener, 2019).

**Tabla 1: Síntomas y signos de afectación de motoneurona superior e inferior.**

Motoneurona Superior	Motoneurona Inferior
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Debilidad (leve)</li> <li>• Atrofia muscular (leve, por desuso)</li> <li>• Hiperreflexia, clonus</li> <li>• Espasticidad</li> <li>• Reflejos patológicos (signo de Babinski)</li> <li>• Pérdida de destreza</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Debilidad (acentuada)</li> <li>• Atrofia muscular (acentuada, precoz)</li> <li>• Hiporreflexia o arreflexia</li> <li>• Hipotonía</li> <li>• Fasciculaciones</li> <li>• Calambres musculares</li> </ul>

El comienzo de la enfermedad suele ser focal, con una gran variación entre pacientes, ya que dependerá de la gravedad y localización de los cambios degenerativos de las neuronas motoras. Los pacientes pueden comenzar con síntomas de motoneurona predominantemente superior y desarrollar la afectación de motoneurona inferior en etapas posteriores, o a la inversa, pueden comenzar con síntomas de motoneurona inferior y con el tiempo desarrollar la afectación de motoneurona superior. Aproximadamente un tercio de los pacientes presentará clínica bulbar al inicio de la enfermedad (Yunusova Y, Front Neurol, 2019).

Las expresiones fenotípicas de la enfermedad pueden ser muy variadas, sin embargo, en la práctica clínica habitual, se suelen categorizar principalmente en dos grupos, ELA bulbar y ELA espinal (Hardiman O, Nat Rev Neurol, 2011). Esta clasificación no está estandarizada y existen también muchas otras clasificaciones distintas basadas en la forma de presentación clínica, por lo que en la actualidad, es necesario alcanzar un consenso para la aplicación de una clasificación común que nos permita combinar los beneficios de una categorización sistemática estandarizada con las descripciones fenotípicas utilizadas en la práctica clínica habitual (Ammar Al-Chalabi, Lancet Neurol, 2016).

1. **ELA de inicio espinal (70%):** La enfermedad comienza con una combinación de afectación de motoneurona superior e inferior en una de las extremidades. Un ejemplo de la enfermedad “clásica” sería el inicio por una mano, con pérdida de fuerza y amiotrofia en eminencia tenar y 1º interóseo. La progresión ocurre centrípetamente con más frecuencia, es decir, se produce una afectación de la mano contralateral antes que en la extremidad inferior homolateral, sin bien son posibles todas las variedades.

En raras ocasiones, la debilidad afecta inicialmente a un hemicuerpo, también conocida como variante hemipléjica de Mills (Leslie I Grad, Cold Spring Harb Perspect Med, 2017) o al territorio de un nervio periférico concreto, como el nervio radial en el “síndrome de mano caída” o el nervio peroneal en el “síndrome de pie caído”. (Wijesekera LC, Neurology, 2009).

Algunos pacientes comienzan con signos de paraparesia espástica propios de afectación de motoneurona superior cortical y mantienen un curso prolongado de varios años (4-5 años) antes de manifestarse la degeneración de motoneurona inferior espinal (Wais V, Acta Neurol Scand, 2017).

2. **ELA de inicio bulbar (30%):** Se presenta con disartria (dificultad en el habla), disfagia (dificultad en la deglución), dificultad respiratoria y trastornos de la voz.

Se puede producir una parálisis laríngea que da lugar a una disfonía espástica, la cual puede dar lugar a un estridor, si las cuerdas se quedan en aducción, o a una hipofonía, si se quedan en abducción. Las fasciculaciones en la lengua o el mentón son signos precoces de la afectación bulbar. En cuanto a la debilidad de la musculatura respiratoria, puede manifestarse con una intolerancia al decúbito, por eso la ELA debe incluirse en el diagnóstico diferencial de la hipoventilación alveolar. Aunque solo el 30% de los pacientes presentan clínica bulbar al inicio de la enfermedad, la mayoría de ellos desarrollarán síntomas bulbares con la progresión de la misma (Yunusova Y, Front Neurol, 2019).

Existen síntomas y signos que son considerados atípicos en la ELA, y que a priori, nos deben hacer dudar del diagnóstico. No encontramos parestesias ni trastornos sensitivos en la ELA (excepto el dolor de los calambres), de forma que la preservación de la sensibilidad es un hallazgo clínico relevante para el diagnóstico. Además, existen grupos de motoneuronas que se muestran más resistentes al proceso degenerativo de la ELA (Hongjun Fu, NatNeurosci, 2018). Las parálisis oculomotoras son excepcionales debido a que las motoneuronas que controlan la musculatura extraocular casi nunca se afectan en la ELA.

Algunos investigadores lo atribuyen a la abundancia excepcional de parvalbúmina o calbindina que poseen esa población de neuronas, ya que dichas proteínas ayudan a neutralizar los excesos de calcio intracelular (Kristopher G Hooten, Neurotherapeutics, 2015). También están típicamente ausentes las alteraciones esfinterianas urinarias y anales, debido a la integridad de las neuronas motoras del núcleo de Onuf en la médula sacra, que controla la musculatura de los esfínteres vesicouretral y anal.

Se trata además de un grupo de neuronas que también ofrece resistencia a la poliomielitis, enfermedad vírica que también afecta selectivamente a las motoneuronas (DisiAn, eLife, 2019).

Sin embargo, observaciones recientes han puesto en relieve una considerable heterogeneidad en la presentación clínica de esta enfermedad, y en los últimos años se han ido notificando casos individuales o pequeñas series de pacientes con características atípicas como la oftalmoparesia (Sharma R, ArchNeurol, 2011) o la disfunción autonómica (Merico A, Amyotrophic Lateral Sclerosis, 2011). Es por ello que los criterios de consenso para el diagnóstico más recientes abarcan las manifestaciones clínicas atípicas en un fenotipo conocido como Síndrome ELA-Plus (Leo McCluskey, J NeurolSci, 2014).

Tradicionalmente se pensaba que en la ELA no se afectan las facultades mentales. Sin embargo, en los últimos años se ha descrito que hasta un 50% de los pacientes pueden presentar un deterioro cognitivo de perfil frontal y en un 15% de los casos coexiste una demencia frontotemporal (Chio A, Neurology, 2019). Este hecho es de gran importancia ya que se ha descrito también un solapamiento patogénico y genético entre ambas enfermedades.

## 1.1.E DIAGNÓSTICO ELA

El diagnóstico de la ELA se basa fundamentalmente en los datos clínicos (tabla 1) y electromiográficos, siendo este último especialmente útil para la confirmación de afectación difusa o multifocal de las motoneuronas cuando aún no es evidente por la clínica. Durante la evaluación de nuevos pacientes con sospecha de ELA son necesarias también pruebas de laboratorio y neuroimagen, con el fin de excluir otras enfermedades que manifiestan características clínicas y electrofisiológicas similares, entre otras, todas aquellas patologías compresivas medulares o del bulbo como la mielopatía cervical espondilítica, tumores agujero occipital, siringomielia, aracnoiditis, fístulas dures o enfermedad de Hirayama.

Entre las pruebas de laboratorio hay que descartar la intoxicación por plomo y mercurio ya que son capaces de producir una denervación difusa que simule una ELA (Traynor BJ, ArchNeurol, 2000) (tabla 4).

El diagnóstico de ELA se establece desde 1990 de acuerdo con los criterios de “El Escorial”. En 1998 los criterios diagnósticos de “El Escorial” se modificaron por la Federación Mundial de Neurología en la Conferencia de la “AirlieHouse”, Warrington, Virginia, EEUU (RossMA, Neurology, 1998)

<http://www.wfnals.org/articles/elescorial1998.htm>.

Tabla 2: Criterios diagnósticos “El Escorial” revisados.

**Diagnóstico de ELA (criterios de El Escorial, revisados en 1998)**

**Es necesaria la presencia de:**

1. Signos clínicos, neurofisiológicos o neuropatológicos de afectación de motoneurona inferior (biopsia muscular con atrofia neurógena simple).
2. Signos clínicos de afectación de motoneurona superior.
3. Los anteriores signos deben de tener carácter progresivo, con afectación sucesiva de diferentes regiones anatómicas demostrada por historia y exploración.

**Con ausencia de:**

1. Signos electrofisiológicos o patológicos de otras enfermedades que puedan explicar la afectación de motoneurona superior y/o motoneurona inferior.
2. Estudios de neuroimagen con lesiones que puedan explicar los síntomas y signos clínicos y los hallazgos electrofisiológicos.

Estos criterios publicados categorizaron el diagnóstico de la ELA en varios niveles de certeza, dependiendo de la presencia y extensión de signos de neurona motora inferior y superior juntos en la misma región topográfica anatómica, tanto en la región bulbar, como en la médula espinal cervical, torácica y lumbar.

La certeza diagnóstica se reafirma cuanto mayor sea el número de regiones anatómicas con signos de lesión de motoneurona superior e inferior y se establecen cuatro categorías diagnósticas: Sospechada, posible, probable y definida.



Tabla 3: Categorías diagnósticas de la ELA.

Categorías diagnósticas de ELA
<b>Definida:</b> Tres regiones anatómicas con afectación de motoneurona superior e inferior.
<b>Probable:</b> Dos regiones anatómicas con afectación de motoneurona superior e inferior, teniendo que estar una de las regiones de lesión de motoneurona superior por encima de cualquiera con afectación de motoneurona inferior.
<b>Posible:</b> Dos o más regiones con afectación de motoneurona superior o una región anatómica con signos de motoneurona superior e inferior.
<b>Sospechada:</b> Dos regiones con afectación de motoneurona inferior.

En 2011 se propusieron los Criterios de Awaji que incluían un nuevo criterio electrofisiológico de la ELA, los potenciales de fasciculación (PFs), como evidencia de signos de neurona motora inferior para proporcionar una detección más temprana de la ELA que en los criterios electrofisiológicos de El Escorial (Okita T, J NeurolSci, 2011). Hay que tener en cuenta que estos criterios se establecieron antes de generalizarse la noción de que una parte importante de los pacientes con ELA tiene trastornos conductuales o cognitivos, lo que se deberá considerar en futuros consensos de diagnóstico.

La carencia de datos objetivos o de marcadores diagnósticos exclusivos de la enfermedad dificulta su diagnóstico en la fase inicial. Además, el rasgo característico de la ELA consiste en la clínica derivada de la muerte progresiva de las neuronas motoras, y tanto el desarrollo como la progresión precoz de esta patología son a menudo insidiosos, por lo que sus síntomas pueden pasar desapercibidos y provocar una demora en el diagnóstico de 9 a 15 meses (Hardiman O, NatRevNeurol, 2011).

### 1.1.F DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Se ha observado una tasa de un 7,3% de diagnósticos erróneos de ELA por patologías que comparten rasgos clínicos comunes (Traynor BJ, ArchNeurol, 2000). Uno de los diagnósticos más frecuentes con los que se puede confundir la ELA, es la neuropatía motora multifocal con bloqueos de conducción. Es importante diferenciarla ya que los

pacientes con esta neuropatía pueden beneficiarse de tratamiento con inmunoglobulinas intravenosas (i.v), mientras que los pacientes con ELA no lo hacen.

Otro de los más frecuentes es la atrofia bulboespinal, también conocida como Enfermedad de Kennedy, que se trata de un trastorno neurodegenerativo de herencia ligada al cromosoma X.

Entre las personas mayores de 60 años el más frecuente es la mielopatía espondiloartrósica, la cual plantea problemas con frecuencia por la elevada presencia de alteraciones de columna en personas de edad media o avanzada, las cuales pueden coexistir con la ELA (Quarracino C, Acta Neurol Belg, 2019).

**Tabla 4: Procesos que se pueden manifestar como una Esclerosis Lateral Amiotrófica. Diagnóstico diferencial.**

<b>Diagnóstico diferencial Esclerosis Lateral Amiotrófica</b>	
Patologías hereditarias	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Amiotrofia bulboespinal (Enfermedad de Kenedy)</li> <li>- Distrofia facioescapulohumeral</li> <li>- Paraparesia Espástica hereditaria</li> <li>- SCA2 y SCA3 (Machado-Joseph)</li> <li>- Glucogenosis tipo II (Enfermedad de Pompe)</li> <li>- Enfermedad de Huntington</li> <li>- Adrenomieloneuropatía</li> <li>- Déficit de Hexosaminidasa (Enfermedad de Tay-Sachs)</li> <li>- Gangliosidosis</li> </ul>
Patologías metabólicas	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Intoxicación por metales (mercurio y plomo)</li> <li>- Latirismo</li> <li>- Toxicidad por Organofosforados</li> <li>- Mielopatía no compresiva por carencia de cobre</li> <li>- Neuromiopatía hipertiroidea</li> <li>- Enfermedad Celiaca</li> </ul>
Patologías inflamatorias/inmunes	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Neuropatía motora multifocal con bloqueos de conducción.</li> <li>- Polirradiculoneuropatía inflamatoria crónica</li> </ul>

	<p>desmielinizante.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Miastenia Gravis</li> <li>- Polimiositis</li> <li>- Síndrome paraneoplásico (carcinoma bronquial o renal)</li> <li>- Linfoma</li> <li>- Paraproteinemia monoclonal IgM</li> </ul>
Patología estructural	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Compresiones medulares (estenosis de canal, radiculopatías, siringomielia, cervicoartrosis, tumores)</li> </ul>
Patología infecciosa	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Neuroborreliosis</li> <li>- Sífilis meningovascular</li> <li>- Poliomiелitis-Síndrome postpoliomiелitis</li> </ul>
Patología degenerativa	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Amiotrofia monomélica (Enfermedad de Hirayama)</li> </ul>

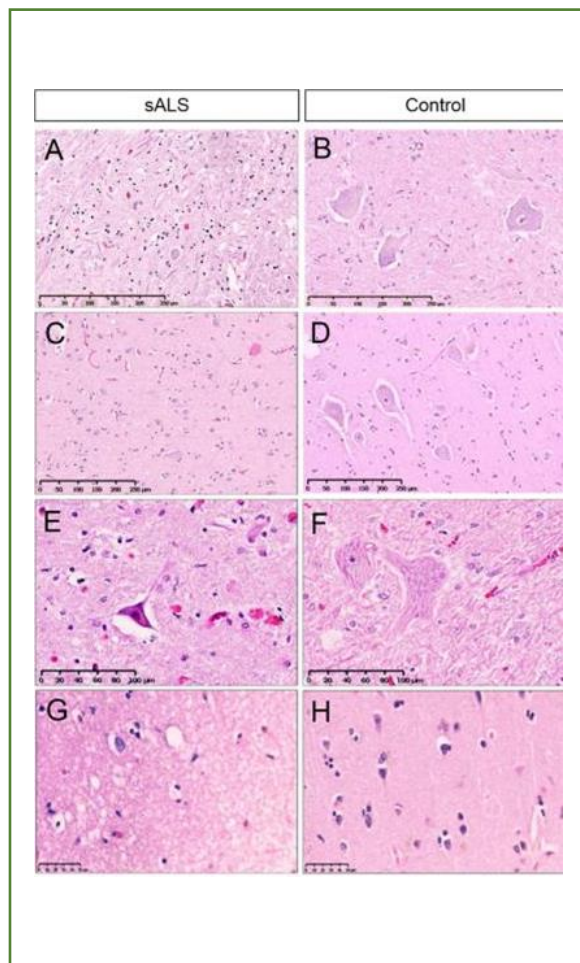
## 1.1.G ANATOMÍA PATOLÓGICA ELA

En la autopsia de pacientes con ELA, se observa una atrofia muscular difusa y una pérdida de masa muscular junto con reducción del tejido adiposo subcutáneo. La atrofia afecta tanto a músculos proximales como distales de las extremidades, lengua, músculos intercostales y diafragma. La médula espinal presenta atrofia macroscópica y las raíces anteriores muestran una decoloración grisácea. En algunos casos se observa también una atrofia frontotemporal significativa en el cerebro, sobre todo en aquellos pacientes que hayan manifestado demencia frontotemporal asociada (Piao YS, Brainpathology, 2003).

Los cambios microscópicos principales de la ELA son dos. Por un lado, una importante pérdida de las neuronas motoras, en corteza motora, en región bulbar y médula espinal. Y, por otro lado, la presencia de inclusiones citoplasmáticas, que contienen una variedad de proteínas ubiquitinadas insolubles, en las neuronas motoras afectadas. Además, la activación de la microglia es un aspecto crítico de la neuropatología de la ELA pues se ha correlacionado con la gravedad de la degeneración de las neuronas motoras (Lasiene J, Neurol Res Int, 2011).

Otras características patológicas que se observan en la ELA, pero que no son específicas de la misma, son la vacuolización y la espongirosis. La vacuolización consiste en la formación de grandes espacios vacíos cerca de las neuronas y la espongirosis está formada por agujeros microscópicos que le dan la apariencia similar a la de una esponja (Saberí S, NeurolClin, 2015).

**Figura 2:**  
Tinción hematoxilina-eosina. Pérdida de neuronas motoras en asta anterior de la médula espinal (A) y la corteza motora (C) respecto a controles sanos (B, D). Atrofia de las neuronas motoras (E) respecto a control sano (F). Vacuolización y espongirosis en la corteza motora (G) respecto a control sano (H).



Como ya se ha mencionado, la histopatología de la ELA es heterogénea y se caracteriza por una amplia variedad de inclusiones citoplasmáticas. Estas inclusiones se forman en las primeras etapas de la enfermedad y son más numerosas en los casos de corta duración que en los casos de larga supervivencia (Schiffer D, NeurophatolExpNeurol, 1991). La principal proteína ubiquitinada presente en la mayoría de los casos es la TDP-43, aunque no se encuentra, o lo hace en una minoría, en los casos de ELA por mutación SOD1 o FUS/TLS (Neumann M, Science, 2006). Las inclusiones citoplasmáticas observadas en la ELA son:

- **Inclusiones en ovillo:** Son estructuras filamentosas intracitoplasmáticas inmunorreactivas para ubiquitina, pero para su detección por métodos inmunohistoquímicos, se busca p62, componente típico del proteosoma, ya que es más específico que la ubiquitina y tiene menor tinción de fondo. Estas inclusiones son sobre todo inmunorreactivas a TDP-43 y son las más frecuentes encontradas en la ELA.

- **Inclusiones redondas:** Están compuestas por filamentos anormales o neurofilamentos que miden de 15 a 20nm. En la tinción hematoxilina-eosina son eosinófilas pálidas y la mayoría son inmunorreactivas para ubiquitina o neurofilamentos fosforilados. Estas inclusiones están formadas por agregados de proteínas TDP-43.
- **Gránulos pequeños:** Se observan con poca frecuencia en neuronas motoras y representan variantes morfológicas de otra forma temprana de inclusiones más grandes. Muchos son positivos para inmunotinción de TDP-43.
- **Cuerpos de Bunina:** Son inclusiones de 3-6 micras, eosinófilas con tinción H-E, que se localizan en las neuronas motoras de la médula espinal y tronco cerebral de pacientes con ELA familiar y esporádica. Se observan con mayor frecuencia en el citoplasma de las neuronas motoras, pero ocasionalmente se pueden encontrar en dendritas. Con la tinción PTHA se tiñen de color violeta, con la de Klüver-Barrera de color azul claro y con el tricromo de Masson de color rojo. Los cuerpos de Bunina con negativos para anticuerpos frente a neurofilamentos, pero son inmunorreactivos para cistatina C y transferrina (Mizuno Y, Acta neuropathologica, 2006) (Okamoto K, Neuroscienceletters, 1993). Curiosamente sigue siendo controvertido si los cuerpos de Bunina son positivos o no para la Ubiquitina.

(Saberri S, Neurol Clin, 2015)

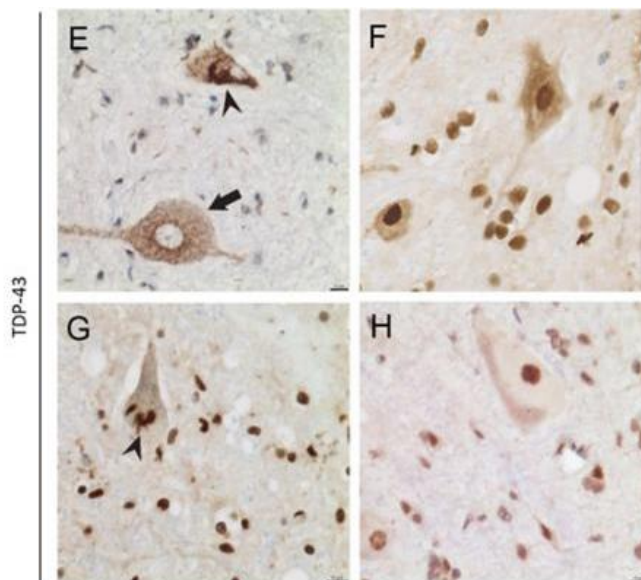


Figura 3: Las inclusiones de TDP43 se muestran como difusas (flecha) o en ovillo (cabeza de flecha) en el citoplasma de las neuronas motoras espinales de ELA (E) frente a TDP43 nuclear en un control sano (F). Inclusiones redondas TDP43 (cabeza de flecha) en corteza motora de ELA (G) frente a TDP43 nuclear en control sano (H).

## 1.1.H PATOGENIA ELA

La ELA presenta una afectación preferente por las neuronas motoras, si bien los factores que determinan su especial vulnerabilidad no son bien conocidos, se postula que puede deberse a los siguientes hechos:

- 1) El gran tamaño de las neuronas motoras, lo cual implica una gran actividad metabólica para mantener sus funciones.
- 2) Requerimientos mitocondriales muy elevados.
- 3) Elevada sensibilidad a los agentes excitotóxicos.
- 4) Capacidad de respuesta reducida ante choque térmico y procesos chaperonadependientes (Ferraiuolo L, Nat Rev Neurol, 2011).

A pesar de los avances logrados en la última década, siguen sin conocerse con certeza los procesos moleculares subyacentes a la enfermedad, sin embargo, existen varias teorías sobre los mecanismos bioquímicos que conducirían a la muerte neuronal, entre las que destacan, sobre todo, el proceso de excitotoxicidad mediada por Glutamato, el estrés oxidativo, el tráfico intracelular, el daño mitocondrial, las alteraciones en el metabolismo proteico y la neuroinflamación (AmmarAl-Chalabi, LancetNeurol, 2014). Se postula que todos estos mecanismos podrían interrelacionarse entre sí y, como consecuencia, provocar la degeneración y la muerte de las neuronas motoras, implicando un proceso en múltiples etapas (AmmarAl-Chalabi, LancetNeurol, 2014).

- **Excitotoxicidad:** El Glutamato es el principal neurotransmisor utilizado por las neuronas para generar señales excitadoras. Su concentración en el espacio extracelular del cerebro se halla sujeta a un control sutil, pues la exposición exagerada tiene efectos letales sobre las neuronas. El Glutamato ejerce su acción fisiológica sobre las neuronas a través de receptores metabotrópicos y receptores ionotrópicos. Estos últimos adquieren interés en el fenómeno de la excitotoxicidad. Cuando estos receptores se activan por la liberación presináptica de glutamato, se convierten en canales que facilitan la entrada postsináptica de Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> en la neurona postsináptica. La acción del glutamato sobre sus receptores es rápida y transitoria puesto que, una vez liberado al espacio extracelular, es retirado de inmediato por transportadores específicos, conocidos como EAAT, que lo reintroducen al espacio intracelular.

El fenómeno excitotóxico se produce cuando en el medio extracelular persisten niveles altos de glutamato (>2-5mM). Los signos de presencia de excitotoxicidad mediada por glutamato consisten en el hallazgo de un aumento del nivel de Glutamato en LCR de pacientes con ELA y una reducción del transportador específico de glutamato localizado en la glía astrocitaria, el EAAT-2. Estas observaciones están apoyadas por muchos estudios in vitro e in vivo (Lin C-LG, Neuron, 1998).

- **Estrés oxidativo:** El SNC es especialmente susceptible al estrés oxidativo debido a que la membrana neuronal contiene una gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados, consume oxígeno a ritmo elevado y contiene altas concentraciones de metales de transición redox-activos pero bajas de antioxidantes.

Diferentes análisis de tejido neuronal postmortem han mostrado daño oxidativo en proteínas, lípidos y ADN de pacientes con ELA (Agar J, Amyotroph Lateral SclerOther Motor NeuronDisord, 2003). En los últimos años, sin embargo, se ha realizado el papel de las células gliales en la degeneración neuronal puesto que varios estudios in vitro han demostrado que el estrés oxidativo experimental en astrocitos y oligodendroglía podría conducir a la degeneración de motoneuronas (EmanueleD'Amico, Free RadicBiolMed, 2013).

- **Defectos en el tráfico intracelular:** El transporte axonal es fundamental para el mantenimiento de la homeostasis neuronal. Las neuronas precisan de transporte anterógrado para el movimiento de componentes estructurales y orgánulos recién formados en el axón y transporte retrógrado para la transferencia de dichos orgánulos y ligandos de sinapsis al soma. Es por ello, que el fracaso de este sistema contribuye en la degeneración de las neuronas motoras (Bilsland LG, ProcNatlAcadSciUSA, 2010).

Estudios recientes han publicado un número cada vez mayor de defectos en el tráfico intracelular en los pacientes con ELA. Diferentes procesos de tráfico intracelular se han relacionado con la patogénesis de la enfermedad, los cuales incluyen, además del transporte axonal, el transporte endosomal, el transporte nucleocitoplasmático y la autofagia. Lo que todavía no queda claro es el papel de las proteínas que los controlan (KatjaBurk, Acta Neuropathol, 2019).

- **Disfunción mitocondrial:** Hay evidencia importante de disfunción mitocondrial en la esclerosis lateral amiotrófica, incluida la morfología mitocondrial anormal en las terminales de nervios motores, el hígado y el músculo (Wiedermann FR, J NeurolSci, 1998). Estudios metabólicos del sistema nervioso han hallado una reducción importante de la actividad del citocromo oxidasa, y un aumento de la actividad del complejo I y II (Browne SE, J Neurochem, 1998).

Posteriormente se ha postulado que puede haber un cambio persistente de  $Ca^{+2}$  desde el retículo endoplasmático (RE) hacia las mitocondrias (ya que ambos orgánulos están conectados funcional y morfológicamente por varias vías), provocando así un agotamiento de  $Ca^{+2}$  en el RE, lo que se traduce en un plegamiento incorrecto de las proteínas y una sobrecarga crónica de  $Ca^{+2}$  mitocondrial, pudiendo estos hechos inducir apoptosis a través de mecanismos dependientes de la proteína Bcl-2 (Tadic V, Front CellNerosci, 2014).

- **Alteraciones en el metabolismo proteico:** La mayoría de las enfermedades neurodegenerativas, entre ellas la ELA, se caracterizan por la presencia de agregados celulares de proteínas aberrantes o mal plegadas. Estos agregados y sus precursores oligoméricos alteran el normal funcionamiento celular y conducen finalmente a la muerte neuronal. El RE (retículo endoplasmático) es el responsable de la síntesis de proteínas, así como de su plegamiento y control de calidad.

En condiciones de estrés celular se produce una disgregación del RE, llamada cromatolisis, que se traduce en una alteración para su capacidad de síntesis proteica y la activación de mecanismos de muerte celular programada. El nucléolo juega un papel central en este proceso pues coordina las respuestas del RE en situación de estrés celular (Javier Riancho, Neurología, 2019).

- **Neuroinflamación:** La neuroinflamación acompaña a la neurodegeneración, sin bien su papel es controvertido y posiblemente se relaciona con un desbalance entre su papel proinflamatorio y neuroprotector (Madelyn E, Acta Neuropathol, 2019). La microglía (responsable de la inmunidad innata del SNC) juega un papel importante pues es conocido que existe proliferación y activación de la microglía en la ELA (Maarten D, Acta Neurol Belg, 2007).



Profundizar en la comprensión del estado de activación de la microglia (M1 y M2) contribuirá al conocimiento sobre el papel específico de la neuroinflamación en la ELA. Así mismo, nuevos hallazgos muestran, que la inflamación en ELA refleja la progresión de la enfermedad como un predictor independiente de supervivencia (Gille B, J NeuroI Neurosurg Psychiatry, 2019).

En la mayoría de los casos, estos eventos descritos, activan y reclutan células no neuronales como astrocitos, microglía y oligodendroglia, que ejercen tanto influencias positivas como negativas en la viabilidad de las neuronas motoras, pero al mismo tiempo afectan también a compartimentos subcelulares como dendritas, soma, axones y uniones neuromusculares, lo que evidencia una intervención celular no neuronal en la patogénesis de la enfermedad (Acary SBO, Arq Neuropsiquiatr, 2009).

### 1.1.1 TRATAMIENTO ELA

Hoy en día no existe tratamiento curativo de la enfermedad, pero esto no significa que sea intratable, ya que, en las últimas décadas, se han desarrollado diferentes intervenciones que prolongan la supervivencia y calidad de vida de los pacientes (Bhattacharya R, Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener, 2019).

Los pilares fundamentales de estas intervenciones son tanto el manejo clínico de los síntomas principales (sialorrea, disartria, disfagia, espasticidad...) y comorbilidades (respiratorias, nutricionales...), como la adaptación del paciente a la pérdida continua de sus funciones, proceso que requiere un abordaje multidisciplinar y continuado.

Esta atención multidisciplinar se ha convertido en el modelo de elección en la atención de los pacientes con ELA en todo el mundo, y es por ello, que se han creado las Unidades específicas de ELA. Estas brindan una atención integral y coordinada asistencial y psicosocial, sin olvidar el abordaje de aspectos emocionales, de información y educación de la enfermedad, intervención para mejorar la autonomía del enfermo y optimización de la calidad de vida. Permiten también la concentración de la experiencia médica en una enfermedad poco frecuente, una mejor comunicación entre los miembros del equipo, facilitando así la toma de decisiones, y un acceso más fácil a la investigación y ensayos clínicos.

A nivel farmacológico, en los últimos años, se ha evaluado la eficacia de múltiples medicamentos en la ELA con resultados infructuosos (Ettore B, Amyotroph Lateral Scler, 2011), (Dmitry P, Front Aging Neurosci, 2017).

Tabla 5: Lista de medicamentos para la ELA probados en ensayos clínicos humanos.

Mecanismo de acción	Fármaco	Forma de administración	Resultado
Anti-Glutamatergicos	Cetriaxona	Intravenoso	Fracaso
	Memantina	Oral	Fracaso
	Riluzole	Oral	Beneficio
	Talampanel	Oral	Fracaso
Anti-Inflamatorios	Celecoxib	Oral	Fracaso
	Eritropoyetina	Intravenoso	Fracaso
	Acetato Glatiramero	Subcutáneo	Fracaso
	Minociclina	Oral	Fracaso
	Minociclina	Intravenoso	Fracaso
	NP001	Oral	Fracaso
	Pioglitazona	Oral	Fracaso
Acido Valproico	Oral	Fracaso	
Anti-Oxidantes	Coenzima Q10	Oral	Fracaso
	Creatina	Oral	Fracaso
	Edaravona	Intravenoso	Beneficio
Neuroprotector	Dexpramipexol	Oral	Fracaso
	Olesoxime	Oral	Fracaso
	TCH346	Oral	Fracaso
	Xaloproden	Oral	Fracaso
Factor Neurotrofico	BDNF	Intravenoso	Fracaso
	CNTF	Subcutáneo	Fracaso
	IGF-1	Subcutáneo	Fracaso
Inhibidores CSF1R	Masitinib	Oral	Beneficio
Otros	Litio	Oral	Fracaso
	Tirasemtiv	Oral	Fracaso

(Dmitry Petrov, Front Anging Neurosci, 2017).

Hasta la fecha solo dos fármacos han sido aprobados por la FDA (*Food and Drug Administration*) para el tratamiento de la ELA, los cuales han mostrado una acción neuroprotectora leve pero constante:

- **Riluzole:** Es un fármaco sintético de benzotiazol con actividad antagonista de la glutamina, que ha demostrado prolongar la supervivencia en pacientes con ELA. El ensayo original y los metaanálisis posteriores de los datos obtenidos de ensayos controlados y aleatorizados, sugieren, que el riluzole aumenta la supervivencia media en aproximadamente tres meses y la probabilidad de sobrevivir un año en un 9%. (Michael Hinchcliffe, *DegenerNeurolNeuromusculDis*, 2017).

Diferentes estudios han observado un efecto beneficioso sobre la función bulbar y de las extremidades pero no mejora la fuerza muscular y no se ha demostrado ningún efecto claro sobre la funcionalidad del paciente (Adriaan D de Jongh, *J NeurolNeurosurgPsychiatry*, 2019). Este fármaco está aprobado en España, no ha mostrado efectos secundarios graves y se emplea en dosis de 50mg dos veces al día.

- **Edaravona:** En 2017 la FDA aprobó el uso de Edaravona en pacientes con ELA. Se trata de un fármaco antioxidante de bajo peso molecular que elimina los radicales de peroxilo solubles en lípidos y agua, eliminando así el peroxinitrito. Es decir, es un fármaco con propiedades antirradicales libres. Diferentes estudios han demostrado que este fármaco inhibe el daño inducido por estrés oxidativo al endotelio vascular y astrocitos y que mejora la diferenciación de OPC a oligodendrocitos, lo que se traduce en efectos protectores en las neuronas motoras mediadas por la protección del endotelio vascular y las células gliales (KazutoshiWatanabe, *J ClinBiochemNutr*, 2018).

Hay otros tratamientos prometedores que se encuentra aún en fase de desarrollo o comercialización:

- **Masitinib:** Es un inhibidor de tirosina quinasa. Los resultados de ensayos preclínicos en modelos celulares muestran un posible mecanismo neuroprotector.

Este efecto se produce mediante la inhibición de formas aberrantes de microglia, las células encargadas del control de la respuesta inflamatoria en el sistema nervioso central (Emiliano Trias, J Neuroinflammation, 2016). El ensayo clínico realizado mostró que los pacientes que recibieron la dosis de 4.5 mg tuvieron una caída menor de la escala funcional comparados con el placebo, además de una menor caída en otros objetivos secundarios. No hubo diferencias significativas entre el grupo tratado con 3 mg/día y el placebo en el objetivo principal.

En estos momentos la comercialización de Masitinib está sujeta a la probable realización de un segundo estudio confirmatorio que permita despejar las dudas metodológicas expuestas por la FDA.

- **Terapias génicas:** Su objetivo es interferir en el curso de la enfermedad a través de la modificación de ciertos genes. Existen diferentes ensayos, todos ellos en fase preclínica y con modelos de experimentación animal (Andrew P, Front Mol Neurosci, 2017).
- **Terapias con células madre:** En los últimos años se ha estudiado el trasplante de células madre como una nueva terapia para pacientes con ELA. En varios estudios preclínicos, utilizando el modelo de ratón SOD1G93A de ELA, se ha demostrado que las células madre son neuroprotectoras. Teniendo en cuenta su alta actividad de proliferación, inmunomodulación y potencial de multidiferenciación, además de su capacidad de secretar factores neuroprotectores, las células madre mesenquimales adultas representan un candidato prometedor. Sin embargo, todavía deben evaluarse los obstáculos técnicos, tales como la dosis óptima, el estado de diferenciación o la vía de administración (Ciervo Y, Mol Neurodegener, 2017).

La capacidad de poder modificar el curso de la enfermedad en el futuro dependerá de nuestra capacidad de comprensión de la biología y patogénesis de la ELA.

## 1.1.J BIOMARCADORES ELA

En los últimos años se está potenciando la investigación y el desarrollo de biomarcadores que puedan ayudar al diagnóstico de la ELA en etapas más tempranas, biomarcadores de pronóstico que puedan orientar a los pacientes sobre la historia natural del proceso en función de su presentación heterogénea, biomarcadores predictivos que nos ayuden a comprender la respuesta potencial a una terapia y biomarcadores farmacodinámicos que nos permitan monitorizar la eficacia de cualquier tratamiento probado durante los ensayos clínicos (Taga A, ExpertREvNeurother, 2018). El principal problema en este ámbito deriva de que, a pesar de haber muchas hipótesis, existe limitado conocimiento sobre la patogénesis de la ELA. Teniendo en cuenta que, hoy en día, la ELA se percibe como una enfermedad multisistémica, la identificación de un panel de biomarcadores que reflejen con precisión las características de la patología es una prioridad, y no solo para fines diagnósticos sino también para predicción de pronóstico y como posible diana terapéutica (Udaya GV, Front Neurol, 2019). Además, la propia investigación en el campo de los biomarcadores ayuda a profundizar en el conocimiento de la fisiopatología de la enfermedad.

En la actualidad se han descrito varios tipos de biomarcadores, que incluyen los marcadores bioquímicos en diferentes fluidos como LCR y suero, marcadores electrofisiológicos y marcadores de neuroimagen, además de los marcadores clínicos y genéticos ya descritos previamente.

### 1.1.J.1 Biomarcadores en LCR:

#### **A.1-Neurodegeneración:**

Los marcadores moleculares más prometedores para la ELA, según Gonclaves et al, son los neurofilamentos fosforilados de cadena pesada (pNHF), ya que se ha observado un aumento de los mismos en LCR de pacientes con ELA y se ha correlacionado con una menor duración de la enfermedad (Gonclaves M, Amyotroph Lateral SclerFrontotemporalDegener, 2017).

En un estudio realizado por Rossi D et al, confirmaron que no solo se elevan los pNHF sino también los neurofilamentos ligeros (NF-L), respecto a controles con otras enfermedades neurológicas inflamatorias, lo cual confirma que los neurofilamentos podrían ser valiosos biomarcadores en la ELA (Rossi D, J Neurol, 2018).

## **A.2- Neuroinflamación:**

Como ya hemos mencionado antes, la neuroinflamación acompaña a la neurodegeneración, sin bien su papel es controvertido y posiblemente se relaciona con un desbalance entre su papel proinflamatorio y neuroprotector (Madelyn E, *Acta Neuropathol*, 2019). Dentro de los marcadores de inflamación, se han estudiado las quitinasas y se ha mostrado que la quitinasa 3 (YKL40) y la quitotriosidasa 1 (ChT-1) en LCR son potenciales biomarcadores de esta enfermedad (Chen X, *BMC Neurol*, 2016), (Andrés-Benito, *AgingAlbanyNY*, 2018). La ChT-1 es una enzima sintetizada exclusivamente por la microglia o por macrófagos infiltrados, que ya se había descrito previamente como marcador de activación microglial en el ictus isquémico (Sotgiu S, *Eur Neurol*, 2005). Estudios recientes demuestran que los niveles elevados de Chit1 en LCR de pacientes con ELA se correlacionan con medidas de progresión de la enfermedad por lo que se propone como marcador pronóstico (Steinacker P, *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2018). Sin embargo, solo un pequeño porcentaje de la población es portadora homocigota para la duplicación de la proteína ChIT1 en el exón 10 que se asocia a la enzima nula, por lo que no es un buen marcador universal (Matinez-Merino L, *NeurodegenerDis*, 2018). Andrés-Benito et al, proponen la chitinase-3-like protein (YKL40), como marcador inflamatorio para la estratificación del paciente (Andrés-Benito P, *AgingAlbanyNY*, 2018).

También se ha estudiado el papel que podría desempeñar el IFN-A en los pacientes con ELA, habiendo demostrado diferentes estudios, un aumento significativo del mismo tanto en suero como en LCR de pacientes con ELA, lo cual apoya la hipótesis de que los IFN podrían estar involucrados en la actividad inflamatoria del SNC en ELA (Liu J, *PLoS ONE*, 2015). Por otro lado, algunos autores como Gao L et al, han encontrado niveles de VEGF significativamente elevados en LCR y suero de pacientes con ELA (Gao L, *NeuroSci*, 2014), sin embargo, estos resultados no han sido corroborados en posteriores estudios (Gonclaves M, *Amyotroph Lateral SclerFrontotemporalDegener*, 2017).

## **A.3- Alteraciones proteicas:**

Otro enfoque para identificar biomarcadores es el uso de la espectrometría de masas para realizar un análisis proteómico. Algunas proteínas propuestas como posibles biomarcadores en LCR, son la Galectina-3 (LGALS3) (Zhou JY, *NeruosciLett*, 2010), (Zubiri I, *MolNeurodegener*, 2018) y la monocytechemoattractant-protein (MPC1) (Gille B, *J NeurolNeurosurgPsychiatry*, 2019). Collins et al proponen cuatro proteínas que, en sus estudios, les permitieron diferenciar a pacientes con ELA, de controles sanos y pacientes con otras enfermedades neurodegenerativas con una sensibilidad del 83% y especificidad del 100%, siendo estas la WD repeat-containing protein 63

(WDR63), amyloid-like protein (APLP1), SPARC-like protein 1 (SPARCL1) y cell adhesion molecule 3 (CAM3) (Collins MA, Proteome Res, 2015). Varios estudios han informado de una disminución constante de Transtirretina (TTR) en LCR de pacientes con ELA (Ryberg H, MuscleNerve, 2010), así como de Cistatina C, la cual se correlaciona positivamente con la supervivencia de los pacientes con ELA y, por lo tanto, podría plantearse como potencial marcador pronóstico (Wilson ME, PLoS ONE, 2010). Otras proteínas analizadas como posibles biomarcadores son la monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), la proteína precursora de amiloide (APP) y la S100B, pero ninguna de ellas ha llegado a mostrar cambios consistentes con resultados contradictorios al intentar replicarlos (Lehnert S, Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener, 2014).

#### **A.4- MicroRNAs (mRNAs):**

Se han planteado como posibles biomarcadores tanto en LCR como en sangre, sin embargo, hasta la fecha, no está claro si los cambios de expresión en los miRNA individuales ejercen su efecto en los genes diana implicados en la etiología de la enfermedad, es decir promueven cambios en la expresión génica, o si simplemente son una expresión de disfunción celular y neurodegeneración (Foggin S, Front Neurol, 2019). También se han publicado estudios realizados en músculo esquelético (Di Pietro L, SciRep, 2017).

### *1.1.J.2 Biomarcadores en sangre:*

#### **B.1- Metabolismo :**

En suero se han estudiado sobre todo alteraciones metabólicas. Kumar A et al, demostraron un aumento de glutamato, ácido beta-hidroxibutírico, acetato y acetona en suero de paciente con ELA respecto a controles, así como una disminución de glutamina, N-acetilaspártato (NAA) e histidina (Chakraborty S, ClinChimActa, 2010). Un estudio realizado sobre 638 pacientes con ELA mostró la utilidad de la albumina en suero como biomarcador de supervivencia, objetivándose niveles superiores en aquellos pacientes con una supervivencia más prolongada (Chio A, JAMANeurol, 2014). Una revisión de Blasco et al, describe con detalle el gran número de metabolitos estudiados en pacientes con ELA (Blasco H, EurJNeurol, 2016).

## **B.2- Estrés oxidativo:**

El eritroide nuclear 2 relacionado con la respuesta antioxidante (Nrf2), tiene como función reducir el estrés oxidativo y se han demostrado niveles séricos disminuidos en pacientes con ELA respecto a controles (Johnson DA, FreeRadicBiolMed, 2015). La proteína SOD1 tiene un papel antioxidante mediante la conversión de radicales libres de superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno. Se ha visto que los pacientes con mutación SOD1 causante de la enfermedad tiene un pronóstico significativamente peor que otras mutaciones (Bali T, J NeurolNeurosurgPsychiatry, 2017).

## **B.3- Neurodegeneración:**

Los pNHF también se han estudiado en sangre de pacientes con ELA y se correlacionan con los niveles en LCR (De Schaepdryver M, JNeurol NeurosurgPsychiatry, 2017). Un estudio realizado por McCombe mostró una asociación entre niveles elevados de pNHF en suero y una progresión más rápida de la enfermedad, sin embargo, solo fue significativa a los cuatro meses de seguimiento (McCombe, JNeuroSci, 2015). La fiabilidad de estos resultados está limitada por el pequeño tamaño de la muestra y periodo de seguimiento. Otro estudio longitudinal que medía los NHF en plasma, no mostró una trayectoria estable, sino que los niveles aumentaron, disminuyeron o se mantuvieron estables a medida que la enfermedad progresaba (Lu CH, Neurology, 2015).

## **B.4- Inflamación:**

También en sangre se ha descrito la ChT-1 y otros marcadores inflamatorios tales como las citoquinas (William RS, J TranslMed, 2019). Los niveles sanguíneos de citoquinas se han estudiado ampliamente, entre las que destacan IL-1b, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, las cuales se han encontrado aumentadas en pacientes con ELA en estudios transversales (Lu CH, NeurolNeuroimmunolNeuroinflam, 2016).

## **B.5- Denervación muscular:**

La creatina quinasa sérica (CK) aumentada en suero, se ha correlacionado con una mayor supervivencia (Tai H, Front Neurol, 2017). La base de datos PRO-ACT mostró que aquellos pacientes con una ELA de rápida progresión presentaban rápida disminución de los niveles de CK mientras que aquellos con progresión más lenta, mantenían niveles estables (Ong ML, PLoS ONE, 2017).



### 1.1.J.3 Biomarcadores en orina

La búsqueda de biomarcadores urinarios en ELA incluye estudios transversales, la mayoría con resultados contradictorios, tales como la utilidad de los oligoelementos urinarios (Oggiano R, Chemosphere, 2018). Se ha notificado también un aumento del receptor de neurotrofina p75 en orina de pacientes con ELA, que aumenta longitudinalmente como la enfermedad (2,3ng/mg de creatinina/año), lo cual sugiere que el p75ECD tiene potencial como posible biomarcador pronóstico (Shepherd SR, Neurology, 2017).

### 1.1.J.4 Biomarcadores por imagen

#### **D.1- Resonancia Magnética convencional:**

Diferentes estudios longitudinales de resonancia magnética (RM), han demostrado un empeoramiento de la atrofia en corteza motora primaria, regiones subcorticales y médula espinal cervical con el paso del tiempo. Esta reducción de volumen, especialmente en región cervical, se ha correlacionado con niveles de discapacidad, por lo tanto, la atrofia cervical puede tener potencial como biomarcador predictivo de progresión (De Albuquerque M, Neuroimage Clin, 2017).

#### **D.2- Imagen por tensor de difusión (DTI)**

Esta técnica aprovecha las diferencias de direccionalidad de la difusión del agua para evaluar la arquitectura del tejido. La fracción de anisotropía (FA) es una medida derivada de esta técnica, que nos permite representar la integridad del tracto. Se ha observado de forma consistente una disminución de la FA, en los tractos corticoespinales y el cuerpo calloso de los pacientes con ELA, que se correlaciona con las medidas clínicas de progresión de la enfermedad (Iwata, Neurology, 2009).

#### **D.3- Resonancia Magnética funcional**

Esta técnica depende del nivel de oxígeno en sangre, de forma que una demanda de energía localizada hace que aumente el suministro de sangre oxigenada en dicha región y esto se traduce en un aumento de señal en la imagen de RM. En los pacientes con ELA se ha observado una sobreactivación de la corteza motora contralateral, durante una tarea motora, que se ha correlacionado con la progresión de la enfermedad (Poujois A, HumBrainMapping, 2013).

#### **D.4- Imagen espectroscópica por Resonancia Magnética**

La imagen espectroscópica mediante resonancia magnética nuclear de protones (H-RMN) es un método no invasivo que nos permite estudiar el perfil de los metabolitos tisulares in vivo. Mediante esta técnica, el metabolito más estudiado es el N-acetilaspártato, el cual refleja la función mitocondrial y en condiciones normales se expresa abundantemente en las neuronas piramidales corticales, sin embargo, se ha encontrado disminuido en los pacientes con ELA (Kalra S, Front Neurol, 2019).

#### **D.5- Imagen de nervio periférico**

En un estudio longitudinal de Simon NG et al, se ha observado una disminución de FA del nervio tibial y peroneo, que se correlaciona con un aumento en las medidas de discapacidad, mostrándose así, como potencial biomarcador de progresión de enfermedad (Simon NG, J Neurol, 2017).

#### **D.6- Imagen muscular**

Un estudio reciente que ha evaluado los cambios en el músculo de todo el cuerpo mediante RM, ha mostrado cambios semicuantitativos de T2 en diferentes regiones del cuerpo en comparación con los controles y un aumento longitudinal en el tiempo a lo largo de cuatro meses, en los cambios de señal en el músculo tibial anterior (Jekins TM, J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2018).

#### **D.7- Tomografía de emisión de positrones (PET)**

Esta técnica evalúa la actividad metabólica de las diferentes regiones cerebrales mediante un derivado de glucosa, la fluorodesoxiglucosa (FDG), marcada con un isótopo radiactivo, el Fluor-18, que se fija en las células cerebrales. Se ha notificado un hipometabolismo en la corteza frontotemporal de los pacientes con ELA, asociándose con mayor deterioro cognitivo y supervivencia más corta (Canosa A, Neurology, 2016).

Curiosamente, también se ha observado un aumento de metabolismo en mesencéfalo, protuberancia, hipocampo, giro temporal superior y cerebelo, lo cual podría ser un reflejo de la hiperexcitabilidad neuronal, cambios celulares adaptativos y proliferación astrocítica. Estos hallazgos corroboran la hipótesis de que las alteraciones metabólicas relacionadas con la ELA no pertenecen exclusivamente a zonas motoras (Pagany M, Neurology, 2014).

## 1.1.J.5 Biomarcadores electrofisiológicos

### **E.1- Estimación electrofisiológica del número de unidades motoras (MUNE)**

MUNE es una estimación que nos permite representar la etapa de la enfermedad en función del número de unidades motoras medidas. Únicamente proporciona información sobre el estado del músculo estudiado, sin embargo diferentes trabajos lo correlacionan con la progresión de la enfermedad (Van Dijk JP, Muscle Nerve, 2010) (Benmouna K, Clin Neurophysiol, 2017).

### **E.2- Índice neurofisiológico (IN)**

El IN, expresa colectivamente los cambios neurofisiológicos estándar observados durante la progresión de la enfermedad como son: Aumentos de latencia distal motora, amplitud del potencial de acción muscular compuesto (PAMC) y frecuencia de evocación de la onda F. Por lo tanto, este índice se ha propuesto como medida cuantitativa de severidad o carga de morbilidad en la ELA (Cheah BC, Amyotrophic Lateral Scler, 2011).

### **E.3- Excitabilidad axonal**

Esta técnica permite la evaluación en vivo de las propiedades biofísicas de los axones. La hiperexcitabilidad axonal promueve la aparición de fasciculaciones y calambres musculares y los cambios de excitabilidad axonal se han correlacionado con medidas de degeneración como la amplitud del PAMC. Por lo tanto, cambios en el patrón de la membrana axonal se podrían correlacionar con progresión de la enfermedad (Kanai K, J Neurol Sci, 2017).

### **E.4- Miografía con impedancia eléctrica (MIE)**

Esta técnica utiliza corriente alterna de baja intensidad y alta frecuencia, se aplica a través de electrodos de superficie sobre un músculo y registra el patrón de voltaje. Se ha correlacionado con la progresión de la enfermedad y ha demostrado su potencial para acelerar ensayos clínicos en fase II al reducir en un 50% el tamaño de la muestra necesaria para detectar el efecto del tratamiento en comparación con otras medidas funcionales de progresión de la enfermedad (Rutkove SB, Muscle Nerve, 2014) (Sanchez B, Neurotherapeutics. 2017).

### **E.5- Estimulación magnética transcraneal (EMT)**

La EMT es una técnica no invasiva que permite estudiar las vías motoras centrales, es decir, la neurona motora superior.

Los cambios en la excitabilidad cortical se han descrito como una característica temprana de la ELA y se relacionan con el patrón de morbilidad de la enfermedad. Sin embargo, por el momento disponemos de resultados contradictorios sobre su capacidad de monitorizar la progresión de la enfermedad (Menon P, Eur J Neurol, 2017).

A pesar de todo este progreso, en la actualidad, carecemos de biomarcadores definitivos, “Gold Standard”, para su empleo en la ELA.

## 1.2 ELA Y DEMENCIA FRONTOTEMPORAL (DFT)

La demencia frontotemporal es heterogénea tanto desde el punto de vista clínico, genético como anatomopatológico. Todos los casos tienen en común una predilección patológica por los lóbulos temporales y frontales, lo cual explica el cuadro clínico en el que predominan los trastornos de la conducta y del lenguaje, así como alteraciones del sistema ejecutivo.

Cuando la clasificamos en diferentes variedades en función de los rasgos histológicos, la denominamos degeneración lobar frontotemporal (DLFT) y la clasificamos en diferentes subtipos en función de sus inclusiones patológicas, entre las que se encuentran la DLFT-U con inclusiones de proteína TDP-43 que representa el 45% de los casos, la DLFT-Tau con inclusiones de proteína TAU que abarca otro 45% de los casos y la DLFT- FUS con el 9% de los casos (Mann DMA, BrainPathol, 2017). Existen tres síndromes clínicos asociados principales, la demencia frontotemporal de variante conductual, la demencia semántica y la afasia progresiva no fluente.

En el subgrupo de DLFT-U se ha observado que dichos síndromes clínicos pueden manifestarse en combinación con clínica de neurona motora/ELA. Así mismo, en dicho subgrupo DLFT-U, se han encontrado mutaciones del C9orf72, descrito también en la ELA.

Por lo tanto, aunque la ELA y la DFT fueron consideradas durante mucho tiempo como dos enfermedades neurodegenerativas diferentes, estos hallazgos descritos en las últimas décadas, tanto en determinadas características clínicas, como el espectro anatomopatológico y los genes causales comunes, nos han llevado a considerar ambas entidades como parte de un mismo espectro patogénico (Couratier P, RevNeurol Paris, 2017).

## 1.2.A CLÍNICA ELA / DFT

En 1990 se publicaron los primeros casos aislados de pacientes que presentaban simultáneamente demencia “presenil” y enfermedad de motoneurona (Neary D, J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1990) pero no fue hasta 1993 cuando Mitsuyama publicó una serie de 71 pacientes, lo que provocó un cambio de paradigma en este campo (Mitsuyama Y, Dement GeriatrCognDisord, 1994). Hoy en día sabemos que aproximadamente el 50% de los pacientes con ELA presentan deterioro cognitivo de perfil frontal, que incluye alteración conductual, deterioro del lenguaje con afasia progresiva y disfunción ejecutiva (Ferrari R, Curr Alzheimer Res, 2011), y que hasta un 15% de los pacientes con ELA cumple criterios clínicos de DFT (Strong MJ, AmyotroPLateralSclerFrontotemporalFegener, 2017).

Al mismo tiempo se ha observado que el 10-15% de los pacientes con DFT presentan evidencia clínica de enfermedad de neurona motora en alguna etapa del curso de su enfermedad (Adeline SL, AnnNYAcadSci, 2015).

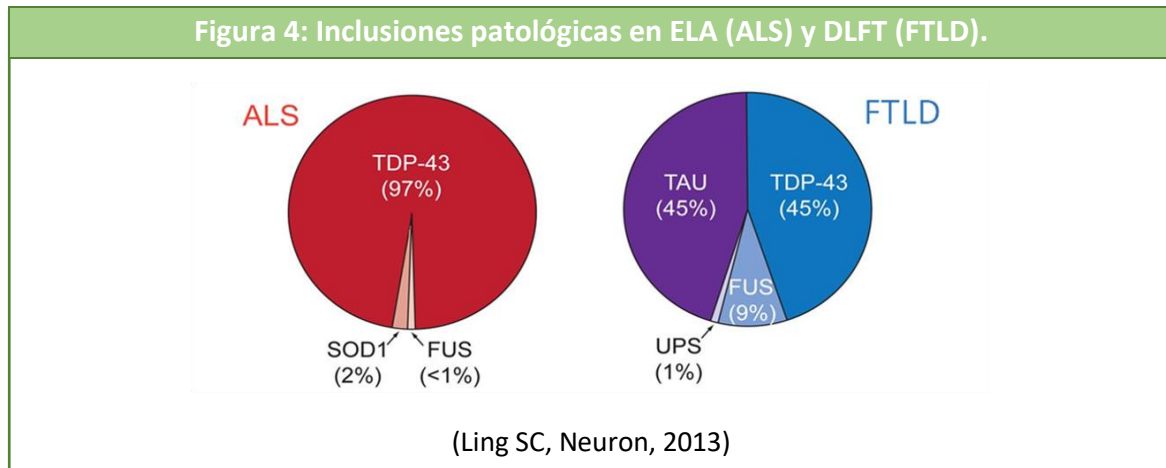
## 1.2.B NEUROPATOLÓGIA ELA/DFT

La superposición clínica entre la ELA y la DFT, también se refleja a nivel neuropatológico. Uno de los avances más importantes en la comprensión de la biología de la ELA comenzó en 1988 cuando Leigh y Lowe descubrieron de forma independiente la ubiquitina, consistente en inclusiones redondas en el citoplasma de las células del asta anterior, tanto en pacientes con ELA familiar como esporádica (Leigh P, Neruosciencieletters, 1988) (Lowe J, Neurosciencieletters, 1988). Estas inclusiones no se detectaban por H-E ni otros métodos de tinción de rutina. Dichas inclusiones se identificaron más tarde en la DLFT y se convirtieron en la piedra angular para distinguir la DLFT con inclusiones Ubiquinadas (DLFT-U) de la DLFT con TAU (DLFT-tau). Tanto en la ELA como en la DLFT-U, las inclusiones ubiquitinas positivas se han observado en la corteza fronto-temporal, en el hipocampo y el estriado, y, aunque se encuentran más comúnmente en las neuronas, ocasionalmente se han visto en células gliales.

En 2006, el TDP43 fue identificado como el componente principal de las inclusiones ubiquitinadas tanto en paciente con ELA como DLFT-U (Arai T, Biochemical and biophysiscalresearchcommunications, 2006). La mayoría de la ELAf y ELAe (excepto SOD1 y FUS) y el 45% de las DLFT (las clasificadas como DLFT-U) muestran proteinopatía TDP43. La TDP43 es una ribonucleoproteína nuclear heterogénea y tiene

muchas funciones celulares diferentes como la estabilidad del ARNm, el procesamiento de ARNm, el transporte y la traducción del ARNm.

En condiciones normales el TDP43 se expresa en muchos tejidos, incluyendo los núcleos de las neuronas motoras y las células gliales. Tanto en la ELA como en la DFTL-U hay pérdida de TDP43 nuclear y formación de agregados patológicos en el citoplasma, si bien el mecanismo causante de esta redistribución no se conoce con certeza (Geser F, Progress in neurobiology, 2011) (Geser F, Neuropathology, 2010).



## 1.2.C GENÉTICA ELA/DFT

Una serie de mutaciones genéticas identificadas en las décadas de 1990 y 2000, distintivas para ELA (SOD1) y DFT (Progranulina) fueron decisivas para que ambas entidades fueran consideradas entonces como dos trastornos distintos no relacionados.

Sin embargo, el solapamiento clínico y neuropatológico, junto con la alta frecuencia de comorbilidad en algunas familias, sugería una mutación genética subyacente común. Finalmente, el descubrimiento de las mutaciones en los genes TARDBP y C9orf72 revelaron el vínculo genético común entre la ELA y la DFT, y puso en relieve, el hecho de que ambas enfermedades podrían ser diferentes fenotipos de un mismo proceso patogénico (Alan ER, Neuron, 2011). Estos descubrimientos captaron la atención de científicos de todo el mundo ya que vinculaba molecularmente dos enfermedades clínicamente distintas. Desde entonces se han descrito también otras alteraciones genéticas compartidas por ambas entidades, aunque menos frecuentes, como las

presentes en los genes TBK1, OPTN, FUS, TUBA4A, CHCHD10, VCP, UBQLN2 Y MATR3 (McCaluley ME, Acta Neuropathol, 2019).

En conclusión, el vínculo clínico, patogénico y genético descrito entre ambas entidades, las sitúa en los extremos opuestos de una misma enfermedad o espectro patogénico.

## 1.3 PROTEÓMICA

Las proteínas son los componentes funcionales que impulsan la mayoría de los procesos celulares. En condiciones fisiológicas, la homeostasis de las proteínas o “proteostasis”, trabaja para mantener la viabilidad celular. Esto es particularmente importante en las células postmitóticas, como son las neuronas, ya que a diferencia de lo que ocurre en la mayoría de los otros tipos celulares, un fallo en la proteostasis no se puede contrarrestar simplemente con apoptosis y reemplazo con nuevas neuronas sanas (Klaips, JCellBiol, 2018).

### 1.3.A INTRODUCCIÓN

La proteómica es un enfoque multidisciplinar para el estudio de la totalidad de proteínas, incluidas sus estructuras, interacciones y modificaciones postraduccionales, codificadas por el genoma humano en condiciones fisiológicas y patológicas. Este sistema logra una identificación de proteínas rápida y eficiente en comparación con el arduo proceso de identificación individual de las proteínas mediante anticuerpos específicos para cada una de ellas (Aslam B, JChromatogrSci, 2017).

Además, nos aporta una comprensión funcional más completa del sistema biológico que estudiamos en lugar de una identificación exclusiva de proteínas puras. Por lo tanto, sus objetivos son, comprender la patogénesis de un proceso e identificar posibles biomarcadores, lo cual es especialmente útil en los trastornos neurodegenerativos, ya que estos se deben a un mal plegamiento y formación de agregados proteicos (Peters OM, JClinInvest, 2015).

El primer paso para llevar a cabo un análisis proteómico consiste en precipitar las proteínas mediante un tampón de lisis y realizar una digestión proteolítica con una proteasa, obteniendo así un conjunto de péptidos que va a ser característico para cada una de las proteínas. Después, se realiza un análisis informático, que consiste en comparar los resultados que se obtienen del espectrómetro de masas con la información disponible en bases de datos que contienen las digestiones teóricas de todas las proteínas descritas hasta la fecha. Una vez identificados grupos de proteínas de interés, se emplea tecnología de micromatrices para crear redes de interacción entre proteínas. La interpretación funcional de dichas redes se realiza utilizando la información presente en la literatura en cuanto a la información biológica y funcional de cada una de las proteínas, es decir, analizando su participación en procesos biológicos o reacciones metabólicas específicas. (Hedl TJ, Front Neurosci, 2019).

La investigación de la proteómica en diferentes campos ha mostrado excelentes resultados, entre los que se encuentra la neurociencia, sin embargo, la alta complejidad que implica el estudio del SNC, ha requerido de la creación de una nueva subdisciplina proteómica denominada “Neuroproteómica” (Ramadan N, MethodsMolBiol. 2017).

### 1.3.B NEUROPROTEÓMICA

La neuroproteómica permite comprender mejor los mecanismos moleculares mediados por las proteínas y las funciones del SNC. Esta técnica ofrece la posibilidad de realizar estudios a gran escala de las funciones, las interacciones, las dinámicas y las estructuras de las proteínas, complementando así a los estudios genómicos y transcripcionales (Kim SI, Neurcherm Res, 2004).

Uno de los principales objetivos de la neuroproteómica es la búsqueda de posibles biomarcadores. El principal fluido utilizado para dicho fin en enfermedades neurodegenerativas es el LCR. Este parece un buen enfoque ya que reside cerca de las neuronas enfermas del SNC, es decir, hay un contacto directo entre el LCR y el tejido del SNC donde se encuentra el microambiente tisular enfermo a partir del cual se secretan dichas proteínas (Collins MA, J Proteome Res, 2015). Sin embargo, el análisis del LCR requiere realizar una punción lumbar, lo cual no siempre es posible realizar a todos los pacientes y puede causar efectos adversos.



Como alternativa, la sangre periférica se obtiene fácilmente, en poco tiempo y sin efectos adversos relevantes, por lo que es una fuente de biomarcadores prometedora. Además, en las enfermedades neurodegenerativas se ha demostrado la existencia de un daño en la BHE con pérdida de pericitos, lo cual, favorece el intercambio de factores entre la sangre y el LCR.

No obstante, la muestra “Gold Standard” para el estudio proteómico de enfermedades neurodegenerativas es el tejido del SNC, ya que es aquí donde se produce el daño que conlleva a la muerte neuronal, lo cual nos permitirá averiguar con mayor certeza los mecanismos patogénicos subyacentes. Sin embargo, la obtención de dichas muestras es sumamente compleja ya que depende de la donación postmortem tanto de pacientes como de controles sanos.

Hasta la fecha se han publicado diferentes estudios proteómicos basados en tejido neurológico humano postmortem centrados sobre todo en enfermedades neurodegenerativas de alta prevalencia como Enfermedad de Alzheimer y Enfermedad de Parkinson (Ramadan N, Methods Mol Biol, 2017), sin embargo, hay muy pocos estudios basados en tejido neurológico postmortem de pacientes con ELA.

### 1.3.C NEUROPROTEÓMICA TISULAR EN ELA

En 2006, se realiza el primer estudio en tejido medular postmortem de pacientes con ELA basándose en la elaboración de perfiles de proteínas mediante espectrometría de masas. En este estudio se encuentran proteínas significativamente alterados en pacientes con ELA versus controles, entre las que destacan la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), hemoglobina alfa y beta, proteína básica de la mielina, tiordeoxina, alfa enolasa y colina acetiltransferasa (Ekegren T, J Proteome Res, 2006).

En 2013 se publica un segundo análisis proteómico en tejido medular postmortem de cuatro sujetos con ELA esporádica versus controles sanos con el objetivo de relacionar la información proteica obtenida por espectrometría de masas en las distintas regiones de la médula espinal (Hanrieder J, J Neurochem, 2013). Ese mismo año se proponen los inhibidores HDAC como posibles agentes neuroprotectores para el tratamiento de la ELA, sin embargo, la gran limitación se encuentra en la presencia de efectos secundarios tóxicos, que se sospecha que pueden estar en relación con un cambio de acetilación en los agregados de proteínas insolubles relevantes en la patogénesis de la ELA.

En este sentido Liu et al realizan un estudio de la acetilación proteica en tejido medular postmortem de la medula espinal de cuatro pacientes con ELA (Liu D, PLoSOne, 2013). En 2015, un equipo de investigadores español realiza un análisis de tejido cerebral de corteza frontal de 6 pacientes con ELA, donde objetivan la existencia de antígenos fúngicos inmunopositivos en el citoplasma de algunas neuronas, detectándose también ADN fúngico mediante el análisis de PCR, descubriendo así la presencia de varias especies de hongos.

Finalmente, mediante análisis proteómico de dicho tejido cerebral demuestran la presencia de varios péptidos fúngicos, por lo que sugieren que la infección por hongos puede desempeñar un papel en la etiología de la enfermedad o constituir un factor de riesgo (Alonso R, Int J BiolSci, 2015). En 2017 con el objetivo de ahondar en el conocimiento sobre la patogénesis de la ELA, se publica un estudio basado en un análisis proteómico integral en la médula espinal de 3 pacientes con ELA esporádica versus controles.

Encuentran 3 proteínas diferencialmente expresadas en asta posterior y 18 en asta anterior, las cuales están implicadas en el metabolismo mitocondrial, la homeostasis de calcio, el transporte de proteínas y el ensamblaje de snRNP (Engelen-Lee, Amyotroph Lateral SclerFrontotemporalDegener, 2017).

En 2018 se publica un análisis proteómico en tejido frontal cortical postmortem de pacientes con ELA, DFT y ELA/DFT (entre ellos un caso con expansión c9orf72) versus controles. Encuentran 8 proteínas diferencialmente expresadas en todo el espectro de pacientes ELA-DFT versus controles, las cuales muestran una fuerte correlación con la patología TDP43 y la disfunción cognitiva (Umoth EM, EMBOMolMed, 2018).

Recientemente, en 2019, basándose en que la acumulación del TDP-43 fosforilado es la principal patogenia de las neuronas afectadas tanto en la ELA como en la DLFT, Laferrière et al, publican un estudio en el que combinaban la espectrometría de masas con el SarkoSpin (el cual es un nuevo método para el aislamiento de TDP43 patológicos) en tejido cerebral postmortem de pacientes con ELA y DLFT-U (Laferrière, NatNeurosci,2019).

**Tabla 6: Artículos publicados sobre neuroproteómica tisular en ELA:**

<b>Muestra utilizada</b>	<b>Referencia bibliográfica</b>
Tejido cerebral ELA-TDP43, DLFT-U	Laferrière, Nat Neurosci, 2019
Corteza frontal no motora y asta anterior médula espinal ELA-TDP43, DLFT-U	Iridoy, Int J Mol Sci, 2018
Tejido cerebral ELA-TDP43, DLFT-U	Umoth, EMBO Mol Med, 2018
Tejido cerebral ELA	Kametani, Sci Rep, 2016
Asta anterior médula espinal ELA	Engelen-Lee, AmyotrophLateral SclerFrontotemporalDegener, 2017
Corteza frontal ELA	Alonso, Int J Biol Sci, 2015
Asta anterior médula espinal ELA	Liu, PLoS One, 2013
Asta anterior médula espinal ELA	Hanrieder, J Neurochem, 2013
Asta anterior médula espinal ELA	Ekegren, J ProteomeRes, 2006

(Hedl, Front Neurosci, 2019)

La ELA es una enfermedad de curso fatal y corta supervivencia, cuya etiopatogenia continúa siendo desconocida. Es una enfermedad heterogénea desde el punto de vista clínico, genético y anatomopatológico y, la carencia de datos objetivos o de biomarcadores diagnósticos, exclusivos de la enfermedad, dificulta su diagnóstico en la fase inicial. Además, cuando llegamos al mismo, carecemos de un tratamiento curativo eficaz en la actualidad. Las alteraciones moleculares a nivel tisular pueden ser caracterizadas a nivel de las proteínas expresadas mediante técnicas proteómicas. Así mismo, algunas de estas alteraciones pueden verse reflejadas a nivel sérico.

Por tanto, nuestra hipótesis es que algunas de las alteraciones proteicas que se producen a nivel tisular podrían monitorizarse en suero y servir como potenciales biomarcadores de la enfermedad. Por ello, nuestro trabajo se centra en la búsqueda de un panel de posibles biomarcadores utilizando la proteómica sobre tejido neurológico humano postmortem como pilar central. La obtención de un biomarcador, que sea objetivo y fácil de medir, podría mejorar no solo las herramientas diagnósticas, sino acelerar el descubrimiento de terapias eficaces al aportar un mejor conocimiento de los procesos patogénicos implicados.

Además, consideramos que el análisis de la expresión proteica en las áreas de neurodegeneración nos ayudará a profundizar en las diferencias y similitudes fisiopatológicas de la ELA frente a la DLFT-U, enfermedad neurodegenerativa de su mismo espectro patogénico, lo cual nos ayudará a encontrar potenciales biomarcadores específicos para la ELA frente a otras tardopatías. La descripción de las alteraciones moleculares subyacentes a la enfermedad, pueden contribuir también en la búsqueda de posibles dianas terapéuticas.

Por lo tanto, los objetivos de esta tesis doctoral son:

1- **Objetivo principal:**

- Identificar un panel de posibles biomarcadores diagnósticos o pronósticos de la ELA utilizando la proteómica sobre tejido neurológico humano postmortem, y tratar de validar el biomarcador más prometedor en suero de pacientes con ELA.

## 2- **Objetivos secundarios:**

- Contribuir a un mejor conocimiento de la fisiopatogenia de la ELA mediante el análisis de la expresión proteica en el área de neurodegeneración, el asta anterior de la médula espinal.
- Profundizar en los rasgos fisiopatogénicos comunes y diferenciales entre la ELA y la DLFT-U.
- Tratar de indentificar una posible diana terapéutica para la ELA.

### 3.1 SELECCIÓN DE PACIENTES Y CONTROLES

Para llevar a cabo este estudio obtuvimos muestras de tejido cerebral postmortem, del Banco de Cerebros y Tejidos Neurológicos de Navarra (Navarrabiomed-FMS), de 9 donantes con ELA con diagnóstico neuropatológico confirmado según criterios de consenso de ELA (Cairns NJ, Acta Neuropathol, 2007) frente a 2 grupos control:

- Tejido neurológico postmortem de 8 sujetos sin enfermedad neurodegenerativa.
- Tejido neurológico postmortem de 8 pacientes afectados de DLFT-U con diagnóstico neuropatológico confirmado según criterios establecidos (Neumann M, Science, 2006).

Para ello se siguieron las directrices de legislación española en el tema de investigación según la Ley 14/2007, del 3 de julio, de Investigación biomédica (referencia: BOE-A-2007- 12945), junto con la aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica de Navarra (Pyto2015/05). Los procedimientos se ajustaban a la Declaración de Helsinki de 1975 revisada en 2000.

La selección de pacientes fue realizada por neurólogos expertos y se utilizaron diferentes criterios de inclusión para cada grupo involucrado en el estudio:

- Para el grupo de pacientes con ELA, se requería el diagnóstico clínico de ELA sin DFT y el diagnóstico neuropatológico de ELA-TDP43 (Cairns NJ, Acta Neuropathol, 2007).
- Para el grupo DLFT-U, se requería el diagnóstico clínico de DFT sin síntomas motores clínicos presentes y el diagnóstico neuropatológico de DLFT-U (Neumann M, Science, 2006).

- Para el grupo de control, se seleccionaron donantes de similar edad y sexo, sin ningún tipo de lesión cerebral ni enfermedad neurodegenerativa, ni antecedentes familiares de ELA o demencia.

En la siguiente tabla se muestran las características clínicas y demográficas de los sujetos:

Tabla 7: Características clínicas y demográficas de los sujetos incluidos en el estudio proteómico										
	Edad*	Exitus**	Sexo	TDP43	EM	Inicio Espinal	Inicio Bulbar	DFT	AF	Riluzole
ELA	56	59	H	+	+	+	-	-	-	+
ELA	71	73	M	+	+	+	-	-	-	+
ELA	54	61	M	+	+	+	-	-	-	+
ELA	66	69	M	+	+	-	+	-	-	+
ELA	67	69	H	+	+	-	+	-	-	+
ELA	47	49	H	+	+	+	-	-	-	+
ELA	61	63	H	+	+	+	-	-	-	+
ELA	25	40	M	+	+	+	-	-	-	+
ELA	71	79	H	+	+	+	-	-	-	+
DLFT	81	88	M	+	-	-	-	+	-	-
DLFT	68	77	H	+	-	-	-	+	-	-
DLFT	76	83	M	+	-	-	-	+	-	-
DLFT	58	73	H	+	-	-	-	+	-	-
DLFT	55	60	M	+	-	-	-	+	-	-
DLFT	79	87	H	+	-	-	-	+	-	-
DLFT	74	84	M	+	-	-	-	+	-	-
DLFT	77	85	H	+	-	-	-	+	-	-
control	-	54	H	-	-	-	-	-	-	-
control	-	26	H	-	-	-	-	-	-	-
control	-	91	M	-	-	-	-	-	-	-
control	-	101	H	-	-	-	-	-	-	-
control	-	72	H	-	-	-	-	-	-	-
control	-	91	H	-	-	-	-	-	-	-
control	-	66	M	-	-	-	-	-	-	-
control	-	88	M	-	-	-	-	-	-	-

\*Edad diagnóstico. \*\*Edad éxitus. EM: Enfermedad de Motoneurona. DFT: Demencia frontotemporal. AF: Antecedentes familiares. M: Mujer. H: Hombre.

Para la validación en suero de la proteína candidata como potencial biomarcador, obtuvimos muestras de sangre, siguiendo las directrices de legislación española en el tema de investigación, Ley 14/2007 del 3 de julio de Investigación biomédica (referencia: BOE-A-2007- 12945), de pacientes con diagnóstico clínico de ELA probable o definitiva según criterios del Escorial (Tabla 2), en seguimiento en la Unidad multidisciplinar de ELA del Complejo Hospitalario de Navarra, y de donantes sanos como grupo control. Ninguno de los pacientes con ELA presentaba clínica de DFT.

**Tabla 8: Características clínicas y demográficas de los sujetos incluidos en el ensayo inmunoenzimático en suero**

	Número sujetos	Edad media	Inicio bulbar	Inicio espinal	DFT
ELA	33	63,8 (36-84)	3	26	0
Control	46	59,3 (32-84)	0	0	0

## 3.2 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

### 3.2.A ANÁLISIS NEUROPATOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICO

Para la extracción del tejido nervioso, se realizó un corte sagital del cerebro para separar ambos hemisferios y, siguiendo el protocolo de Brainet Europa (Bell JE, Acta Neuropathol, 2008), el hemisferio izquierdo se fijó en 10% formaldehído durante 4 semanas para realizar los estudios morfológicos. Se obtuvieron muestras de estructuras cerebrales representativas de áreas corticales y subcorticales, tronco cerebral (incluido bulbo raquídeo), cerebelo y médula espinal, las cuales se fijaron en parafina con el fin de hacer el diagnóstico neuropatológico.

El tejido neurológico de cada región de interés, fijado en parafina, fue dividido en secciones de 5µm y conservado con hemexilina para su posterior análisis inmunohistoquímico con el anticuerpo monoclonal antifosfoTDP43 (1: 80.000, p5409/410, Cosmo Bio). Se visualizó utilizando un inmunostainizador de diapositivas automatizado (Leica Bond Max) con Bond Polymer Refine Detection (Leica Biosystems Newcastle Ltd). En las secciones del tronco cerebral se incluyeron la tinción azul Luxol rápido y CD 68 para el estudio de la patología de la mielina.



En todos los casos de ELA se objetivó degeneración de la neurona motora superior e inferior, acompañada de inclusiones neuronales p-TDP43. Los casos DLFT-U mostraron depósitos de TDP43 en corteza cingulada anterior y regiones límbicas, pero ausencia de los mismos en el área de la médula espinal. Estos casos se clasificaron en uno de los cuatro subtipos patológicos del sistema de clasificación recientemente actualizado para la patología FTLD-TDP43 (FTDL-TDP tipo A-D) (Neumann M, Neuropathol Appl Neurobiol, 2019).

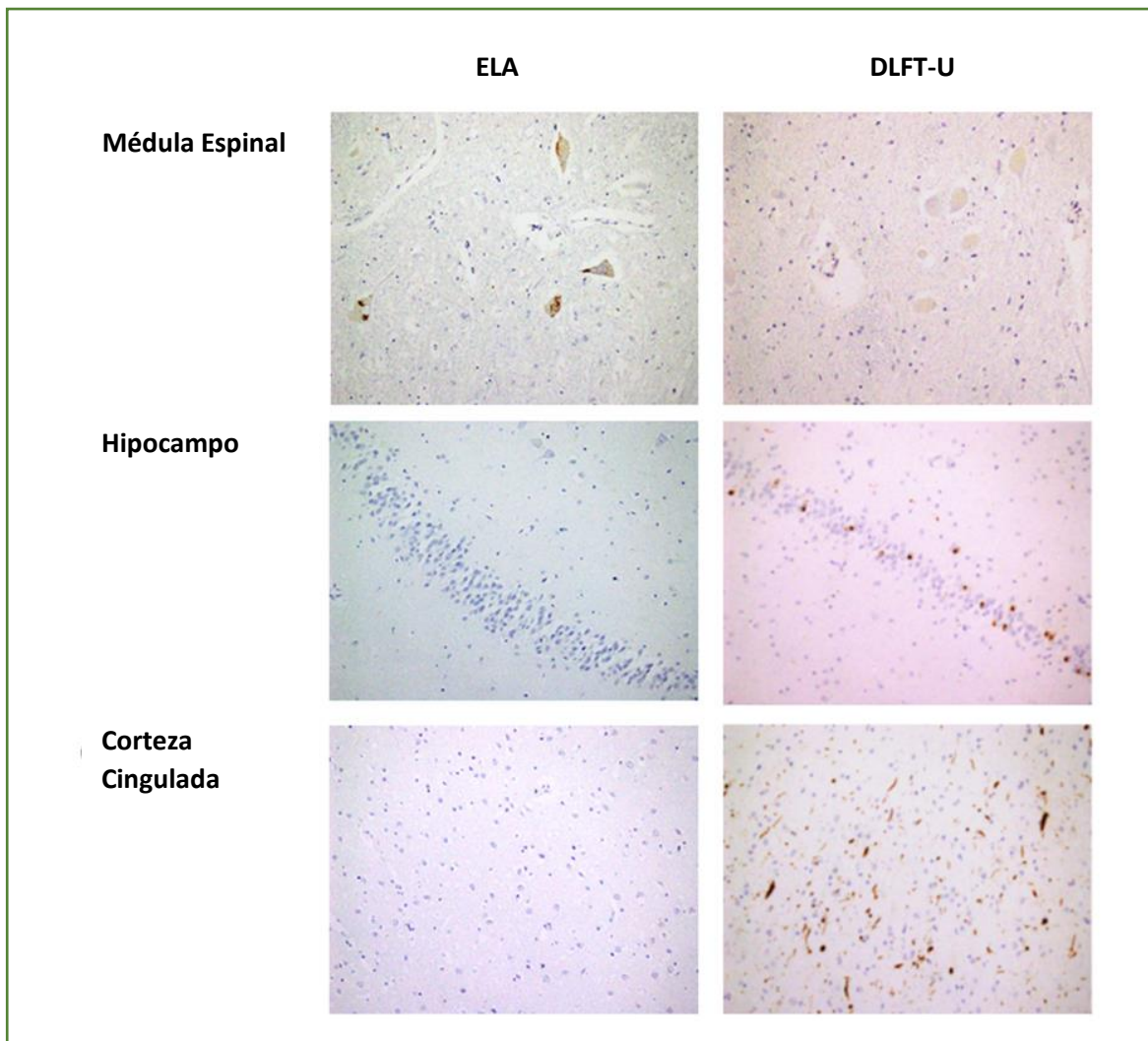


Figura 5: Imágenes anatomopatológicas de los sujetos incluidos en el estudio.

**Médula espinal:** Depósitos de pTDP43 en neuronas del asta anterior de pacientes con ELA y tinción negativa en neuronas del asta anterior de pacientes con DLFT-U.

**Hipocampo:** Tinción negativa en la fascia dentata del hipocampo de los pacientes con ELA e inclusiones intracitoplasmáticas de pTDP43 en pacientes con DLFT.

**Corteza :** Tinción negativa en pacientes con ELA e inclusiones intracitoplasmáticas y neuritas largas de pTDP43 en pacientes con DLFT (caso de demencia semántica).

## 3.2.B EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS A PARTIR DE TEJIDO NEUROLÓGICO

Para el análisis proteómico se obtuvieron muestras del asta anterior de la médula espinal y de la corteza frontal no motora. Estas muestras de tejido neurológico postmortem congelado, se homogeneizaron en tampón de lisis que contenían 7 M de urea, 2 M de tiourea y 50 mM de DTT mediante interrupción mecánica asistida por un Potter (Sartorius, Potter S). Los homogeneizadores se centrifugaron a 100.000 x g durante 1 h a 15°C. Los extractos de proteínas se precipitaron con metanol/cloroformo y los pellets se disolvieron en 6 M de Urea, 100mM de Tris pH 7.8. Finalmente, las proteínas se cuantificaron con el kit de ensayo Bradford (Bio-Rad) y 100gr de cada extracto proteico fueron sometidos a digestión enzimática utilizando tripsina (Promega, ratio 1:50, p/p) a 37°C durante 16 horas. Para la purificación y concentración de péptidos se utilizó una matriz de fase reversa (C18 ZipTip, Millipore).

## 3.2.C ANÁLISIS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Previo al análisis con el espectrómetro de masas, los péptidos se separaron mediante cromatografía de fase inversa utilizando una bomba nanoLC ultra 2D equipada con una columna de separación de fase reversa de 75 µm de diámetro interno y 250mm de longitud (Eksigent 0.075 x 250mm). Las muestras habían sido previamente cargadas para su desalación y concentración en una precolumna de 100 µm de diámetro interno y 5mm de longitud, empaquetada con una matriz de igual química que la columna de separación. Como fase móvil se utilizaron dos tampones: Buffer A (100% agua, 0,1% ácido fórmico) y Buffer B (100% acetonitrilo + 0,1% ácido fórmico).

El fraccionamiento peptídico se realizó durante 240 minutos (min) en dos pasos, primero el gradiente aumento de 5% B a 25% B en 210 min y luego de 25% B a 40% B en 30 min. Después la columna se equilibró en 95% B durante 5 min, y 5% B durante 14 min. Durante todo el proceso, la precolumna estuvo en línea con la columna y el flujo mantenido a lo largo del gradiente a 300 nl/min.

Después de su elución de la columna, los péptidos fueron analizados en un espectrómetro de masas 5600 Triple-TOF (Sciex). La adquisición de datos se obtuvo tras un escaneo en un rango de masa de 350- 1250 m/z en 250 milisegundos (ms). Se seleccionaron los 35 picos principales para su posterior fragmentación. El tiempo mínimo de acumulación para MS/MS se estableció en 100 ms, lo que dio un ciclo total de 3.8 segundos (seg).

Los iones resultantes se escanearon en un rango de masa de 230-1500 m/z y se excluyeron de otra fragmentación durante 15 seg.

### 3.2.D ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS

Los datos de espectrometría de masas se adquirieron usando el software Analyst 1.7.1 (Sciex). Para la identificación de proteínas se empleó el motor de búsqueda ProteinPilot (v.5.0-Sciex), que utiliza el algoritmo Paragon™ (v.4.0.0.0) y Progroup™ para la agrupación de datos. Para ello se utilizó la base de datos de referencia de proteoma humano UniProt (Proteome ID:UP000005640, 70902 proteínas, diciembre de 2015).

Para el cálculo del FDR (*False Discovery rate*) se utilizó un método de ajuste no lineal usando la base de datos señuelo, obtenida a partir de la base de datos de referencia, aceptando como válidas aquellas identificaciones que mostraron un FDR del 1% o inferior. La cuantificación de proteínas se realizó utilizando el software Progenesis LC-MS (versión 2.0.5556.29015, Waters).

Mediante la utilización de la masa y tiempo de elución de los diferentes péptidos, los cromatogramas fueron alineadas para compensar las variaciones entre carreras en el cromatógrafo. Para ello, todos los cromatogramas se alinearon con uno de referencia, elegidos automáticamente por el software, y se generó una lista de características teniendo en cuenta los valores m/z y los tiempos de retención. La calidad de estas alineaciones se supervisó manualmente con la ayuda de los criterios de calidad proporcionados por el software.

Los archivos, con la identificación de los péptidos, se exportaron desde el software Protein Pilot e importaron al software Progenesis LC MS, donde se combinaron con la lista de características. Los archivos de datos de salida se analizaron utilizando scripts de R para posteriores análisis estadísticos y representación. Se eliminaron las proteínas identificadas por sitio (identificación basada únicamente en una modificación postraducciona), las proteínas inversas (identificadas por la base de datos de señuelos) y los posibles contaminantes. Las proteínas cuantificadas con al menos dos péptidos únicos, un valor p-value en la prueba t-test inferior a 0,05, y una tasa de cambio <0.77 (regulación descendente) o >1.3 (regulación ascendente) en escala lineal, se consideraron como diferencialmente expresadas.

Para la interpretación funcional de los resultados obtenidos, se utilizaron herramientas bioinformáticas como DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) Bioinformatics Resources versión 6.7 (Huang da W, Curr Protoc Bioinformatics, 2009) y Reactome tools (Croft D, Nucleic Acids Res, 2014). La identificación de redes metabólicas específicamente desreguladas se realizó mediante el software STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes) versión 9.1 (<http://stringdb.org/>) (Franceschini A, Nucleic Acids Res, 2013). Adicionalmente, se utilizó el software IPA (Ingenuity® Pathway Analysis) (QIAGEN Redwood City, [www.qiagen.com/ingenuity](http://www.qiagen.com/ingenuity)). Este software contiene información obtenida de bases de datos de origen experimental y predictivo, lo que permite la representación de funciones, vías y redes de interacción entre proteínas. El software genera valores de significancia (valores p) entre cada evento biológico o molecular y las moléculas importadas en función de la prueba exacta de Fisher ( $p < 0,05$ ).

### 3.2.E ANÁLISIS DE INMUNODETECCIÓN (WESTERN-BLOT)

Las proteínas de interés fueron validadas mediante Western-blot. Para ello se cargaron cantidades iguales de proteína (10 $\mu$ g) en geles 4-15% o 10-20% Criterion™ TGX Stain-Free™ (Bio-Rad), dependiendo del peso molecular de las proteínas de interés. Las proteínas separadas por electroforesis, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa utilizando Trans-Blot Turbo (Bio-Rad) durante 7 minutos a una constante de 2.5A, hasta 25V. La carga de proteína de los geles se evaluó mediante la digitalización de los geles (stain-free digitalization). Las membranas fueron incubadas con anticuerpos primarios a diluciones de 1:1000 o 1:100 en leche sin grasa al 5% o albúmina sérica bovina (BSA) (Tabla 9).

Después de la incubación con el anticuerpo secundario apropiado (anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano picante), y la incubación con un sustrato de quimioluminiscencia (Perkin Elmer), se realizó la detección de la unión de anticuerpos mediante el sistema Chemidoc™MP Imaging System (Bio-Rad). Todas las intensidades de la banda se densitometraron mediante el software Image Lab Versión 5.2 (Bio-Rad). Los valores de densidad óptica se expresaron como unidades arbitrarias y se normalizaron a la intensidad total en cada carril.

Tabla 9: Western blot

Western Blot	Dilución primario	Ac	Dilución secundario	Ac	% acrilamida del gel	Solución de bloqueo y dilución Ac
LGALS3	1-1000		Anti-ratón e 1-5000		4-15%	5% leche
TTR	1-1000		Anti-ovino p 1-3000		4-15%	5% leche
SELENBP1	1-1000		Anti-conejo t 1-5000		10-20%	5% leche
Pin1	1-1000		Anti-conejo t 1-5000		10-20%	5% BSA
S100A11	1-100		Anti-conejo t 1-5000		10-20%	5% leche
S100A6	1-1000		Anti-conejo t 1-5000		10-20%	5% BSA
CAYBP	1-1000		Anti-conejo t 1-5000		10-20%	5% BSA
ROCK2	1-10000		Anti-conejo t 1-5000		10-20%	5% leche
PHB1	1-1000		Anti-conejo t 1-5000		10-20%	5% BSA
PHB2	1-1000		Anti-conejo t 1-5000		10-20%	5% BSA
AKT	1-1000		Anti-conejo t 1-5000		10-20%	5% BSA
Pakt	Jan-00		Anti-conejo t 1-5000		10-20%	5% BSA
FAK	1-1000		Anti-conejo t 1-5000		10-20%	5% BSA
Pfak	1-1000		Anti-conejo t 1-5000		10-20%	5% BSA
ERK	1-1000		Anti-conejo t 1-5000		10-20%	5% BSA
pERK	Jan-00		Anti-conejo t 1-5000		10-20%	5% BSA
MEK	1-1000		Anti-conejo t 1-5000		10-20%	5% BSA
pMEK	1-1000		Anti-conejo t 1-5000		10-20%	5% BSA
NAGK	1-250		Anti-conejo t 1-5000		4-15%	5% leche

### 3.3 ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO EN SUERO

Para la validación de potenciales biomarcadores en suero se utilizaron ensayos de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). En concreto, se midieron las concentraciones séricas de NAGK y SELENBP1 mediante kits de ELISA siguiendo las indicaciones del fabricante (NAGK: MBS9311625; SELENBP: MBS2021743, ambos de MyBioSource). Los rangos de detección de los kits son 0.156-10 ng/ml para SELENBP1 y 0.625-20 ng/ml para NAGK.

Los datos fueron analizados empleando el software GraphPad Prism. Para la comparación entre grupos se empleó el test de ManneWhitney, considerando valores de p-value menores de 0,05 como estadísticamente significativos.

#### 4.1 DESEQUILIBRIO PROTEOSTÁTICO EN MÉDULA ESPINAL DE SUJETOS CON ELA Y DLFT-U

Mediante técnicas basadas en espectrometría de masas, se identificaron un total de 2318 proteínas en el asta anterior de la médula espinal, de las cuales, se pudieron cuantificar 1002. De estas, 281 proteínas presentaron una expresión diferencial estadísticamente significativa al comparar los casos de ELA respecto a los controles sin enfermedad neurodegenerativa (figura 7). Por otro lado, entre los casos de DLFT-U y los controles sin enfermedad neurodegenerativa, solo 53 proteínas mostraron una expresión diferencial estadísticamente significativa en el mismo área anatómica (figura 8). Entre dichas proteínas desreguladas, se objetivó que 32 eran comunes entre los sujetos con ELA y DLFT-U (figura 6 y tabla 10). La mayor parte de las proteínas desreguladas se observaron exclusivamente en los casos de ELA, ya que, dichas proteínas comunes representaban un porcentaje del 11 % del total de las proteínas alteradas en los sujetos con ELA, en contraste con el porcentaje del 60 % del total de las proteínas alteradas en los sujetos con DLFT-U.

Figura 6: Diagrama de Venn

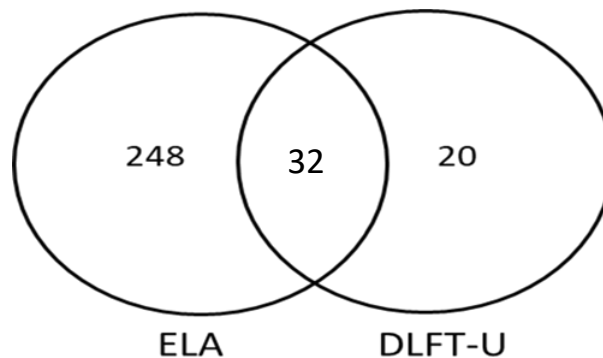


Figura 6: El diagrama de Venn ilustra el número de proteínas significativamente alteradas en cada enfermedad, respecto a los controles sanos, y la superposición observada entre ambas

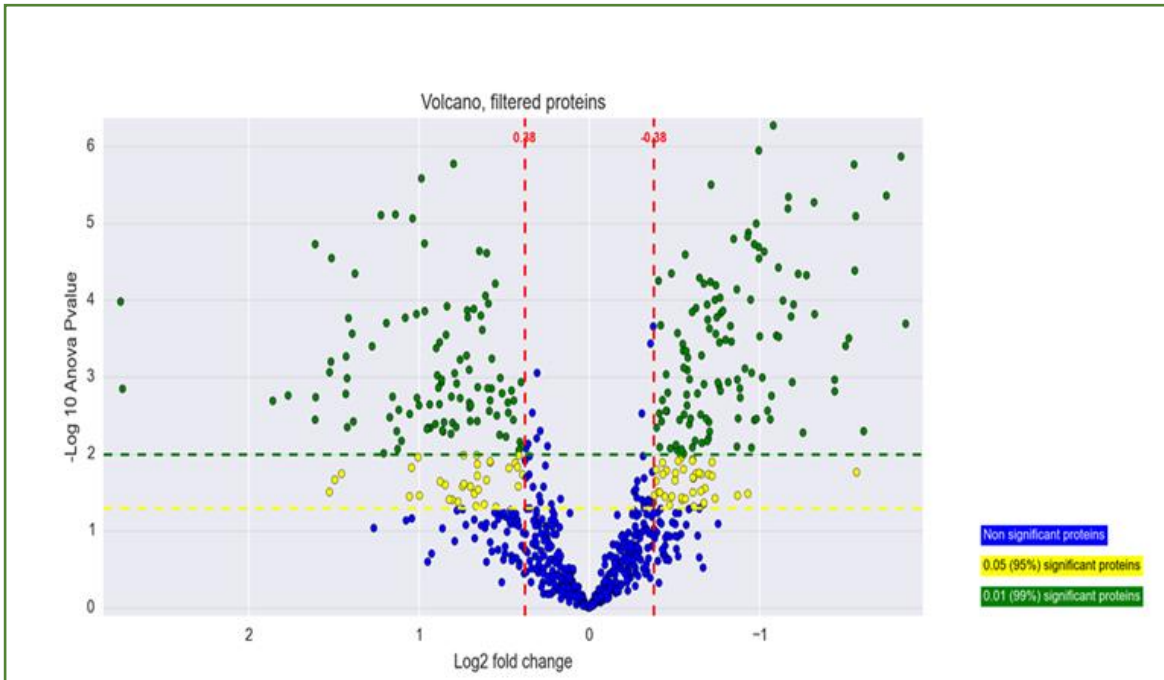


Figura 7: Volcano 1- ELA versus controles sanos.

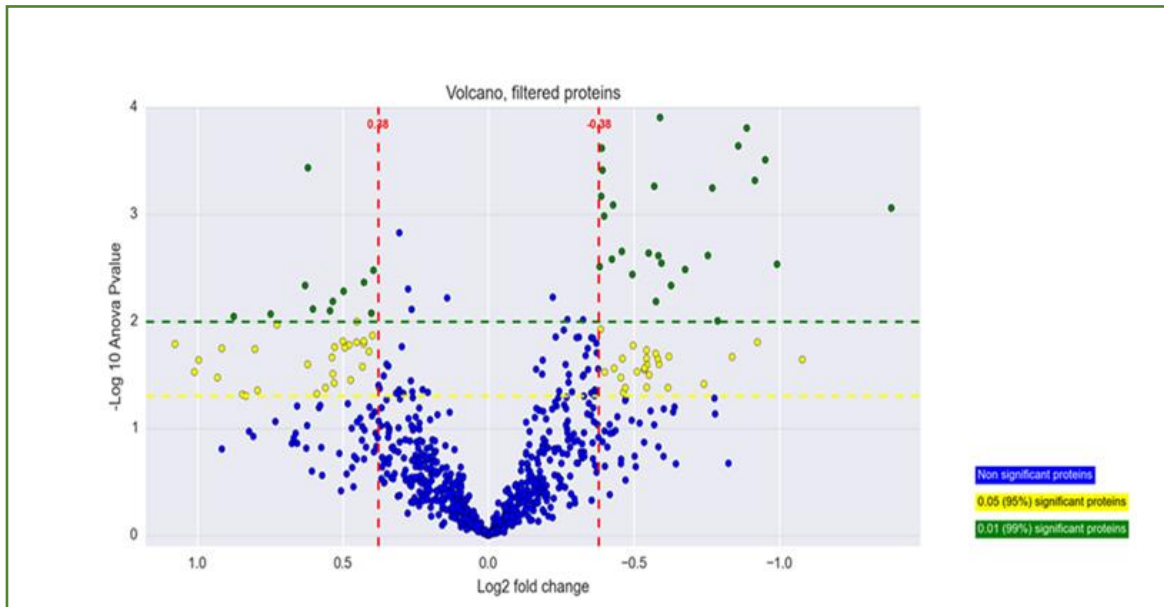


Figura 8: Volcano 2- DLFT-U versus controles sanos.



Figuras 7 y 8: Gráficas Volcano Plot: Representan la comparación cuantitativa entre los proteomas control vs ELA (7) y DLFT-U (8).

En el eje de abscisas se representa la tasa de cambio (fold-change) para cada proteína como la diferencia de sus medias en Log2. En el eje de ordenadas se representa el p-value asociado al t-test para cada comparación como  $-\text{Log}_{10}$  p-value. Cada punto representa una proteína. Las proteínas agrupadas en el centro, de color azul, son aquellas que se expresan igual en ambos grupos. Las dos líneas rojas marcan el punto a partir del cual las proteínas se encuentran infraexpresadas (lado izquierdo) y sobreexpresadas (lado derecho). Por encima de la línea amarilla se encuentran aquellas proteínas en cuya expresión se objetivan con diferencias estadísticamente significativas, con un p valor inferior a 0,05 y por encima de la línea verde las que presentan un p valor menor a 0,001.

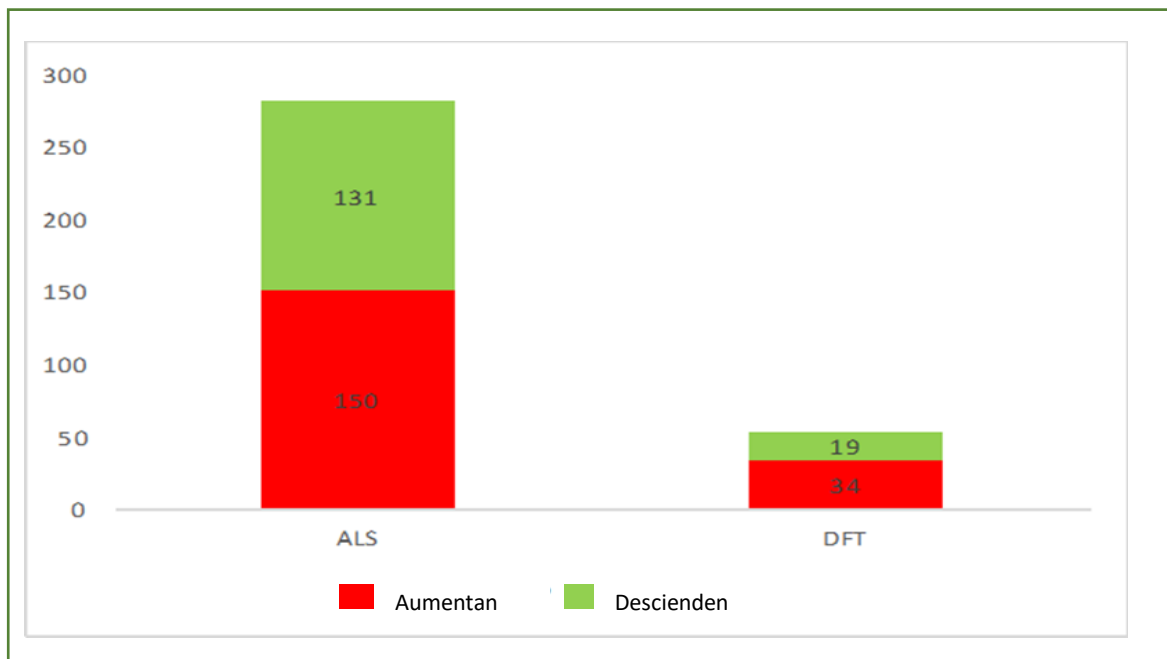


Figura 9: Gráfica de barras:

Describe el número de proteínas significativamente alteradas en cada enfermedad.

Aumentan (rojo): Proteínas sobreexpresadas respecto a controles sanos.

Descienden (verde): Proteínas infraexpresadas respecto a controles sanos.

Cabe destacar que, entre las proteínas significativamente alteradas en los casos de ELA, 14 habían sido previamente propuestas como potenciales biomarcadores o como proteínas relevantes implicadas en la fisiopatogenia de la ELA (Tabla 11). En el estudio proteómico se detectó que seis de estas proteínas estaban reguladas al alza, mientras que las ocho restantes estaban significativamente reguladas a la baja en los casos de ELA. Por lo tanto, nuestros datos proteómicos coinciden con las alteraciones caracterizadas previamente en la enfermedad de la ELA.

**Tabla 11: Proteínas previamente descritas asociadas a la ELA y diferencialmente expresadas en los sujetos con ELA de nuestro estudio.**

Proteínas sobreexpresadas							
Nombre proteína	Gen	Código Uniprot	Valor p ELA	FC ALS	Función Molecular	Función biológica	Referencia
Protein disulfide-isomerase	P4HB	P07237	0.00	1.07	Actividad isomerasa	Respuesta estrés oxidativo	Woehlbier U, EMBO J, 2016
Transitional endoplasmic reticulum ATPase	VCP	P55072	0.00	0.71	Actividad ATPasa	Apoptosis, Reparación ADN	Elf K, JProteomic, 2014
Protein S100-A6	S100A6	P06703	0.00	1.42	Proteína de unión Ca <sup>2+</sup> /Zn <sup>2+</sup>	Axonogenesis Transducción de señal	Botelho HM, JBiolChem, 2012
Galectin 3	LGALS3	P17931	0.01	0.52	Proteína de unión	Respuesta inflamatoria, Factor de empalme	Zhou JL, JProteoRes, 2010
Prealbumin	TTR	P02766	0.00	1.37	Proteína de unión al retinol	Trasporte de tiroxina	Ranganathan JNeurochem 2005
Proteínas infraexpresadas							
Nombre proteína	Gen	Código Uniprot	Valor p ELA	FC ELA	Función molecular	Función biológica	Referencia
Superoxide dismutase [Cu-Zn]	SOD1	P00441	0.05	-0.32	Cataliza superoxido	Respuesta al estrés oxidativo	Rosen DR, Nature, 1993
Alpha-internexin	INA	Q16352	0.01	-0.95	Neurofilamentos	Estructura axonal y transporte	Wong NK, JNeuropath 2000

Neurofilament medium polypeptide	NEFM	P07197	0.00	-0.71	Nuerofila-mentos	Estructura axonal y transporte	Fialová L, JNeurol, 2010
Neurofilament heavy polypeptide	NEFH	P12036	0.00	-0.97	Neurofila-mentos	Estructura axonal y transporte	Lu CH, JNurolNeuros Psychiatry, 2015
Tubulin alpha-4A chain	TUBA4A	P68366	0.00	-1.20	Estructural micro-túbulos	Trasporte axonal	Smith DN, Neuron, 2014
Cystatin-C	CST3	P01034	0.01	-0.67	Inhibidor proteasa lisosómica	Regula homeostasis celular	Wilson ME, PLoSOne, 2010
Optineurin	OPTN	Q96CV9	0.00	-1.03	Tráfico celular, ExocitosisC. Golgi	Homeostasis celular y transporte	Maruyama H, Nature, 2010
Vesicle-associated membrane protein-associated	VAPB	O95292	0.01	-0.60	Proteína de unión	Señalización, Proteostasis, Transporte, RE	Alsultan AA, DegenerNeurolNeuromusc Dis, 2016
Rho associated protein kinase 2	ROCK2	O75116	0.00	-1.01	Estructural	Organización citoesqueleto	Chuang HH, BiochemJ, 2012

## 4.2 PERFIL NEUROANATÓMICO DE LA ELA Y DLFT-U: ESPECIFICIDADES DE CADA REGIÓN Y ENFERMEDAD.

Para validar los resultados obtenidos en el estudio proteómico y caracterizar los niveles de dichas proteínas en la región diana de cada enfermedad (asta anterior en pacientes con ELA y corteza frontal no motora en pacientes con DLFT-U), se utilizó la técnica de inmunodetección o Western Blot. Para ello se evaluó la expresión de determinadas proteínas de interés en la médula espinal y en la corteza frontal no motora de cada uno de los pacientes incluidos en el estudio. Las proteínas de interés se seleccionaron en base a su alteración de expresión en los pacientes con ELA y DFT en comparación con los controles y los procesos moleculares y biológicos en los que se encuentran implicadas.

Por lo tanto, se realizaron experimentos adicionales para:

1. Verificar los resultados proteómicos mediante un nuevo análisis de la misma región (médula espinal) analizada en la fase de descubrimiento.
2. Evaluar paralelamente la expresión de las mismas proteínas en la región diana de la DLFT-U (la corteza frontal no motora).

Para realizar la validación, por un lado, se eligieron cuatro proteínas cuya regulación en la ELA estaba descrita previamente en la literatura y que en nuestro estudio mostraron una alteración de expresión estadísticamente significativa en sujetos con ELA respecto a controles:

- Galectina-3 (LGALS3)
- Prealbúmina (TTR)
- Proteína S100-A6 (S100A6)
- Proteína cinasa asociada a la Rho 2 (ROCK 2)

Por otro lado, se seleccionaron cinco proteínas que no se habían relacionado previamente con la ELA, pero que en el análisis proteómico mostraron una expresión diferencial en sujetos con ELA y que relacionaron con alteraciones metabólicas descritas como implicadas en la ELA:

- Metanotiol oxidasa (SELENBP1)
- Peptidil-prolil cis-trans-isomerasa de unión a NIMA 1 (Pin1)
- Proteína fijadora de calciclinas (CACYPB)
- N-acetilglucosamina (NAGK)
- Proteína S100-A11 (S100A11)

Las nueve proteínas (LGALS3, TTR, S100A6, ROCK2, SELENBP1, Pin1, CACYBP, NAGK y S100A11) se clasificaron en los siguientes tres perfiles de expresión diferencial de acuerdo con los patrones de regulación observados en los resultados del Western Blot.

#### 4.2.A REGULACIÓN ESPECÍFICA POR REGIÓN Y ENFERMEDAD: LGALS2 y SELENBP1

Las proteínas LGALS3 y SELENBP1 presentaron una regulación específica por zona y enfermedad. Estas proteínas mostraron una notable regulación al alza en la médula espinal de los pacientes con ELA, pero no así en la corteza frontal no motora. Sin embargo, en los pacientes con DLFT-U, esta significativa regulación al alza solo se pudo detectar en la corteza frontal no motora, pero no así en asta anterior de la médula espinal. Por lo tanto, ambas proteínas mostraron una regulación específica en el área objetivo de cada una de las enfermedades (figura 10).

#### 4.2.B REGULACIÓN ESPECÍFICA POR ENFERMEDAD EN ELA: TTR, S100A6, S100A11, PIN1

Las proteínas TTR, S100A11, S100A6 y Pin1 presentaron una alteración específica en la ELA. Se confirmó que estas proteínas estaban alteradas de manera significativa en los casos de ELA pero no así en los casos de DLFT-U. Las proteínas TTR, S100A11 y S100A6 se identificaron exclusivamente en la médula espinal, presentando todas ellas una considerable regulación al alza en el asta anterior en los pacientes con ELA y una ausencia de cambios relevantes en corteza frontal no motora en pacientes con ELA. La Pin1 se encontró infraexpresada tanto en asta anterior como en corteza frontal no motora, exclusivamente en los pacientes con ELA. No se observaron cambios significativos en ninguna de dichas proteínas, ni en médula espinal ni en corteza frontal no motora, en los pacientes con DLFT-U (figura 10).

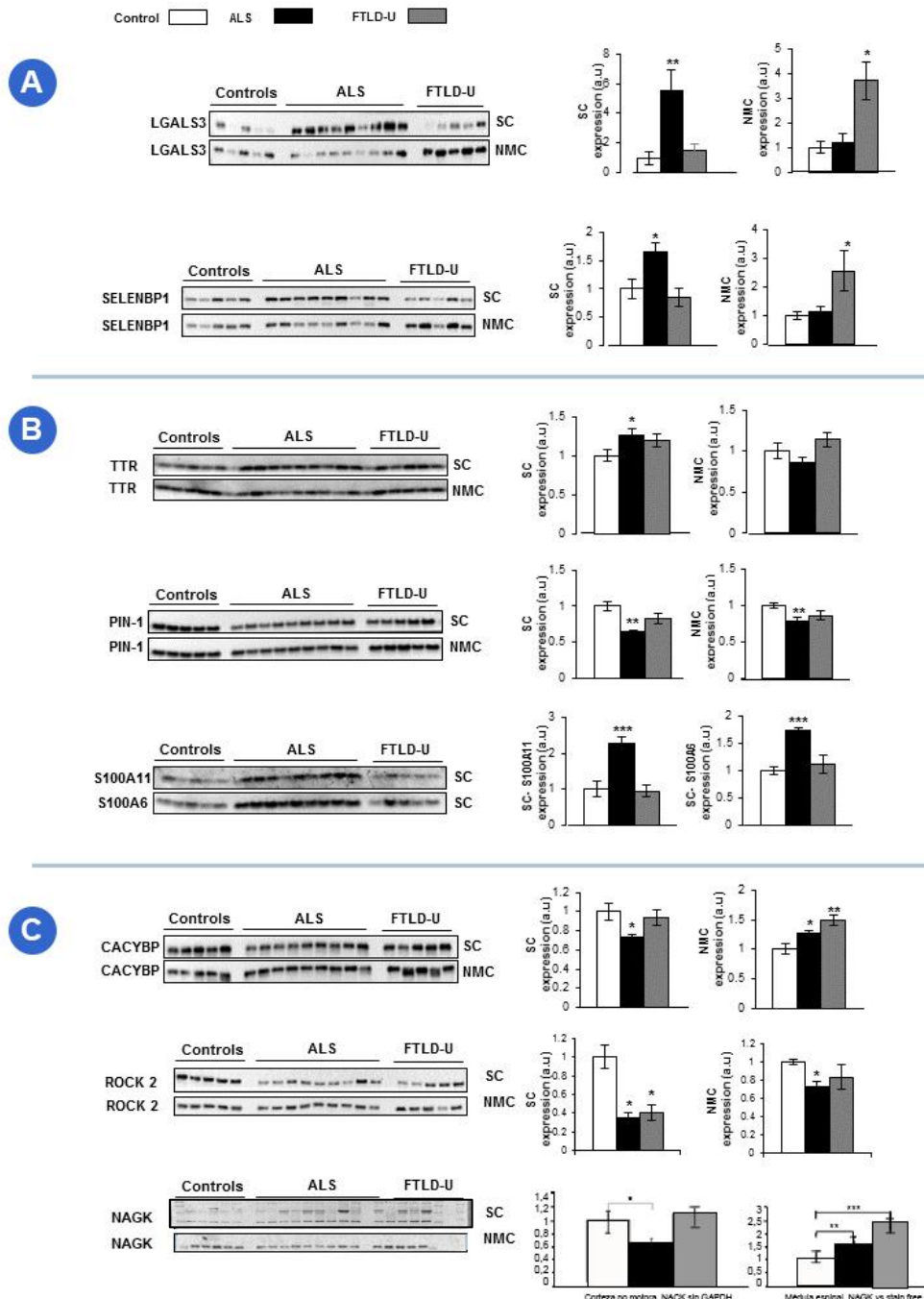
#### 4.2.C SIN REGULACIÓN ESPECÍFICA POR REGIÓN NI ENFERMEDAD: CACYBP, ROCK2 Y NAGK.

Se observó que la proteína CACYBP estaba regulada a la baja de manera significativa en la médula espinal de los pacientes con ELA, mientras que en la corteza frontal no motora se observó una tendencia opuesta, presentando una notable regulación al alza en los casos de ELA y un aumento aún más drástico en los pacientes con DLFT-U. También se confirmó la regulación a la baja de la proteína ROCK 2 en ambas regiones, siendo esta regulación a la baja más significativa en la médula espinal en ambas enfermedades; no obstante, se observó que esta regulación a la baja era ligeramente

superior en la médula espinal y la corteza frontal no motora de los pacientes con ELA. La proteína NAGK se encontró sobreexpresada en asta anterior tanto de pacientes ELA como DLFT-U, e infraexpresada únicamente en la corteza frontal no motora en sujetos con ELA (figura 10).

Figura 10: Validaciones mediante Western Blot

- A) Regulación específica por región y enfermedad
- B) Regulación específica por enfermedad en ELA
- C) Sin regulación específica por región o enfermedad.



**FIGURA 10 - Validaciones mediante Western Blot:** En cada trazado se representan la densidad óptica para muestras de control (blancas), muestras de ELA (negras) y DLFT-U (gris). La expresión diferencial se evaluó en la médula espinal (SC) y la corteza frontal no motora (NMC) para todas las proteínas en estudio, excepto en AS100 A11 y AS100A6 que solo se podían medir en la médula espinal. \* valor  $p < 0.05$ , \*\* valor  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . unidades arbitrarias.

### 4.3 REDES DE INTERACCIÓN: VÍAS METABÓLICAS INVOLUCRADAS EN LAS ALTERACIONES PROTEÓMICAS OBSERVADAS EN ELA Y DLFT-U.

Para realizar una interpretación biológica con el set de proteínas diferenciales utilizamos el software Ingenuity Pathway Analysis (IPA). El IPA utiliza información de origen experimental y predictivo para generar redes de interacción específicas en las vías que involucran al proteoma desregulado. Para ello, se crearon redes independientes del interactoma de las proteínas, para cada uno de los fenotipos de enfermedad, ELA y DLFT-U.

Los análisis funcionales realizados revelaron una disfunción mitocondrial y un deterioro metabólico tanto en los casos de ELA (Figura 11) como en los de DLFT-U (Figura 12). Además, se observó una sobrerrepresentación del metabolismo del ácido nucleico y la producción de energía en los casos de ELA. Mientras que en los casos de DLFT-U, se observó un aumento de la tasa de muerte celular y una alteración de la regulación de proteínas relacionadas con la supervivencia.

Una característica adicional de las redes de interacción propuestas por IPA es la capacidad de señalar y destacar los actores potencialmente relevantes que no se detectan en el estudio proteómico. En este sentido, las redes de interacción obtenidas en nuestro estudio identificaron diferentes mediadores de señalización celular, incluidas la alfa serina/treonina cinasa (AKT), la proteína kinasa activada por mitógenos 1 (ERK) y la proteína kinasa de doble especificidad activada por mitógenos 1 (MAP2K).

(Figuras 11 y 12). La implicación de estos potenciales candidatos se consideró un aspecto interesante a analizar con mayor detenimiento.

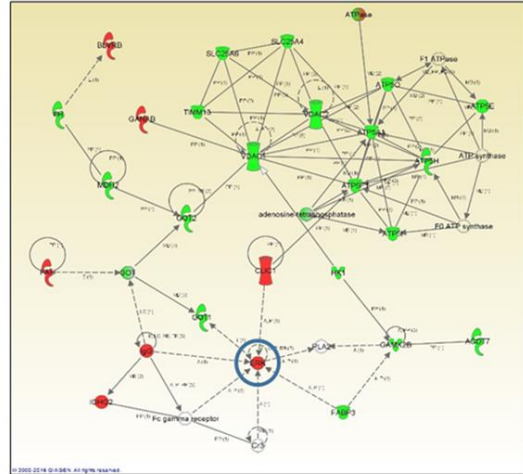
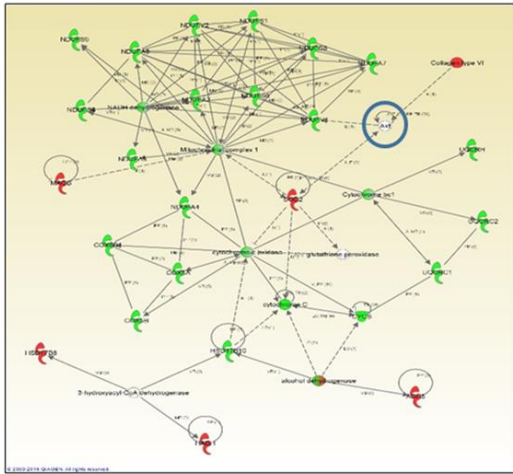


Figura 11: Mapas de interacción de proteínas ELA versus controles: Las proteínas sobreexpresadas se resaltan en rojo y las infraexpresadas en verde. Las líneas continuas y discontinuas representan interacciones directas e indirectas respectivamente. Las proteínas rodeadas por un círculo azul están involucradas en la señalización celular. Esta red permite visualizar el deterioro mitocondrial y metabólico. La segunda representa el metabolismo y producción de energía relacionada con la interacción proteica.

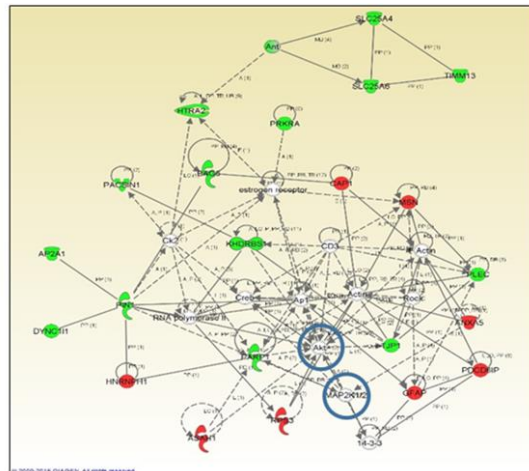
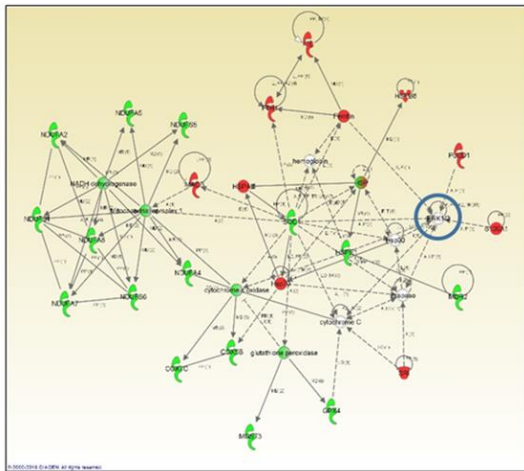


Figura 12: Mapas de interactoma de proteínas DLFT-U versus controles: Las proteínas sobreexpresadas se resaltan en rojo y las infraexpresadas en verde. Las líneas continuas y discontinuas representan interacciones directas e indirectas respectivamente. Las proteínas rodeadas por un círculo azul están involucradas en la señalización celular. La primera figura representa deterioro mitocondrial y metabólico. La segunda representa muerte y supervivencia celular.



Como ya hemos mencionado, las redes de interacción revelaron una interrupción común en el eje de la kinasa de adhesión focal 1 y la alfa serina/treonina proteína kinasa (FAK/AKT) en el espectro ELA-DFT y una activación específica de la vía de la proteína Kinasa activada por mitógenos (MAP2K) en los pacientes con DLFT-U. El estudio proteómico no había detectado la AKT, la proteína de doble especificidad kinasa-cinasa 2 activada por mitógenos (MEK) ni la MAP2K, aunque sí identificó ERK, que se encontraba regulada al alza en los pacientes con ELA.

Se realizaron estudios posteriores para monitorizar el estado de activación de este panel de kinasas en las zonas cerebrales seleccionadas, la médula espinal, y la corteza frontal no motora en el espectro ELA-DLFT-U (Figura 13).

- **AKT:** En estos estudios se observó que las proteínas AKT y pAKT se encontraban reguladas a la baja en la médula espinal tanto de los casos de ELA como de los casos de DLFT-U, siendo esta regulación a la baja muy significativa en los pacientes con ELA. Al analizar únicamente la corteza frontal no motora, solo se observó una regulación a la baja considerable de la proteína AKT en los pacientes con DLFT-U.
- **FAK:** Las proteínas FAK y p-FAK presentaban una significativa y muy significativa regulación al alza, respectivamente, en la médula espinal de los pacientes con ambas enfermedades, mientras que estaban reguladas a la baja de forma significativa en la corteza frontal no motora únicamente de los pacientes con DLFT-U.
- **ERK:** En el experimento proteómico se observó una regulación al alza de la proteína ERK, observándose la misma tendencia en el Western Blot, pero sin significación estadística. No obstante, se detectó una importante regulación al alza de la proteína pERK en la corteza frontal no de los pacientes con DLFT-U.
- **MEK:** También se observó una desregulación importante de las proteínas MEK y pMEK en la corteza frontal no motora en ambas enfermedades, concretamente de la MEK en los casos de ELA y de la pMEK en los casos de DLFT-U. Estos hallazgos sugieren la existencia de implicaciones regionales diferenciadas de los diferentes factores que regulan los procesos de señalización celular en cada enfermedad.

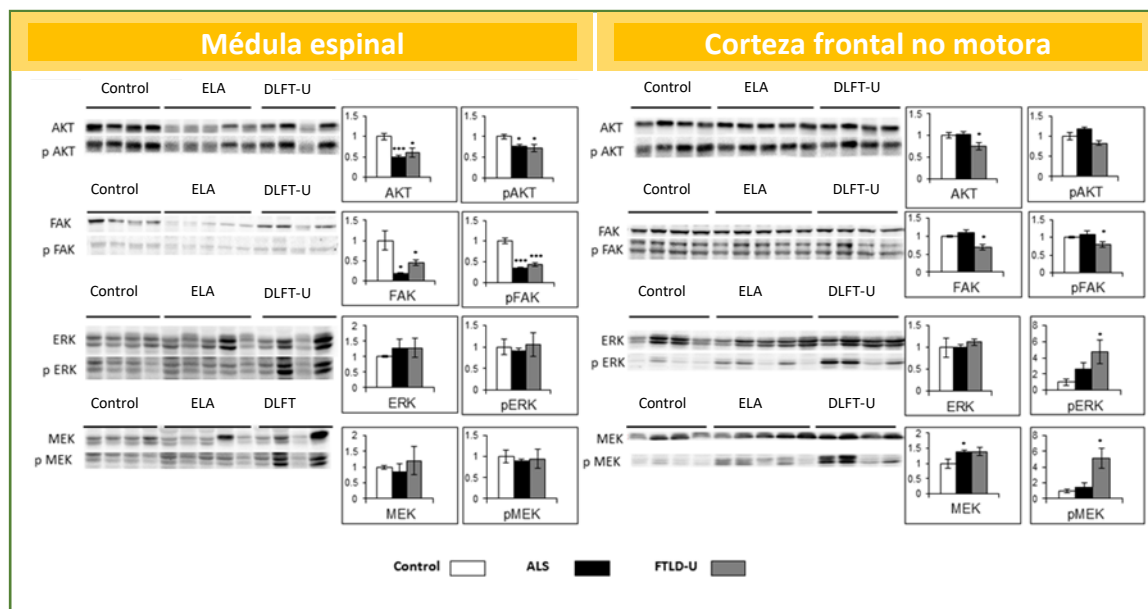


Figura 13: Señalización celular. Regulación diferencial entre ELA (ALS) y DLFT-U (FTLD-U) en diferentes regiones del SNC. El lado izquierdo de la figura muestra los resultados de todas las proteínas de señalización medidas en la médula espinal (Spinal cord), mientras que el lado derecho de la figura muestra los resultados obtenidos en la corteza frontal no motora (Non motor cortex). En el eje “y” se representa la densidad óptica en unidades arbitrarias. Las muestras de los controles sanos se representan en blanco, las muestras de ELA en negro y las de DLFTU en gris. \* valor  $p < 0.05$ , \*\* valor  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

#### 4.4 COMPLEJO PROHIBITINA (PHB) COMO SENSOR DE ALTERACIÓN MITOCONDRIAL DE MANERA DIFERENCIADA EN ELA Y DLFT-U

Tanto la PHB1 como la PHB2 se encontraron reguladas a la baja en la médula espinal en ambas enfermedades, siendo más importante la regulación a la baja de la PHB2. Curiosamente, se observó que la PHB1 y la PHB2 solo estaban reguladas de manera significativa en las muestras de corteza frontal no motora de los pacientes con DLFT, mientras que su tendencia a estar reguladas a la baja no era significativa en los casos de ELA (Figura 12). Estos datos demuestran el impacto del espectro de la ELA-DLFT sobre el complejo PHB, ya que se produce una disfunción mitocondrial en la médula espinal tanto en los casos de ELA como DLFT-U, mientras que en la corteza frontal no motora solamente se altera en los pacientes con DLFT-U.

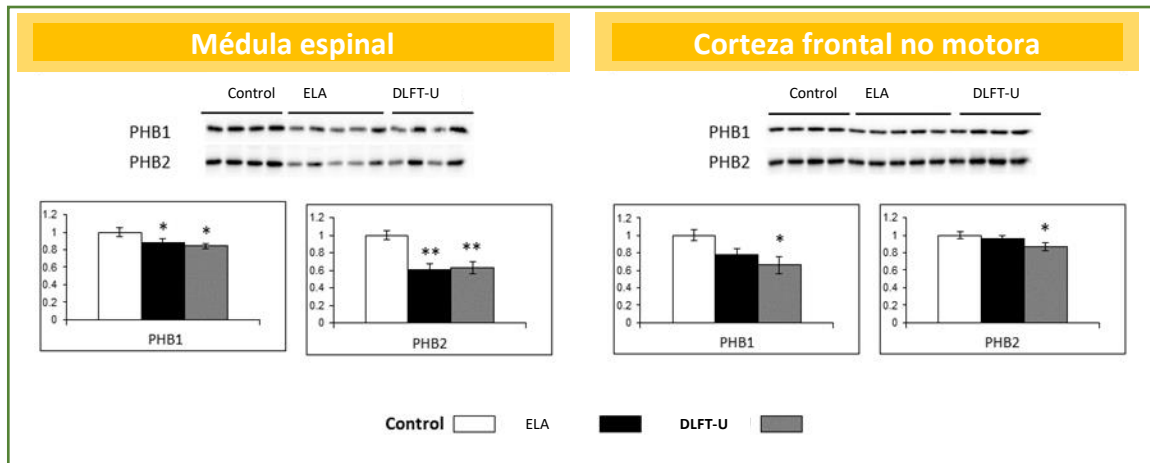
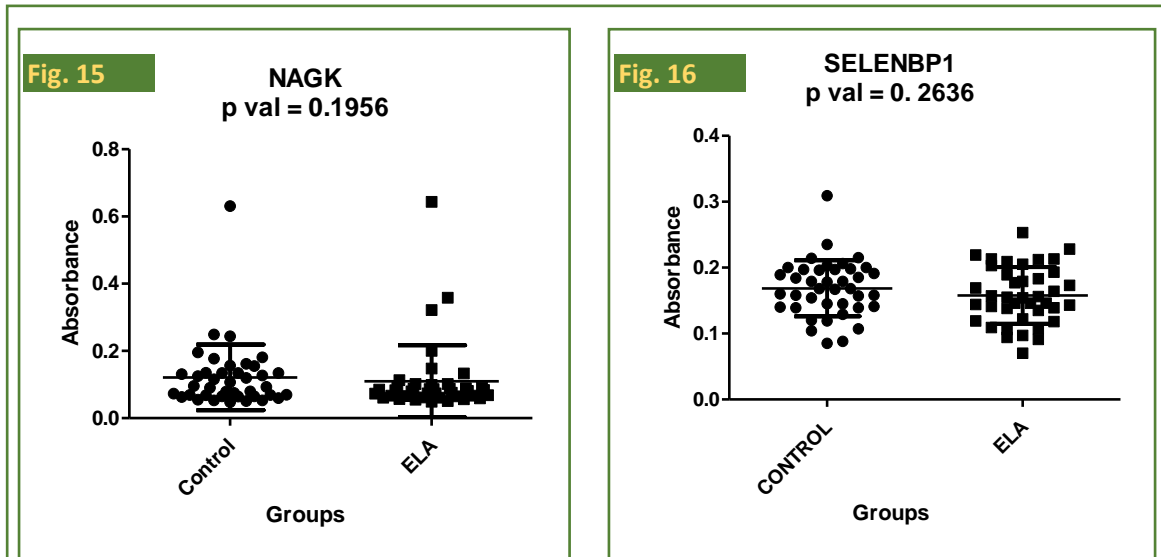


Figura 14: Alteración mitocondrial: Regulación a la baja de PHB1 y PHB2 en pacientes con ELA (ALS) y DLFT-U (FTLD-U), tanto en médula espinal (Spinal cord) como en corteza frontal no motora (Non motor cortex).

La regulación a la baja es estadísticamente significativa para ambas proteínas en ambas enfermedades al analizar el tejido de la médula espinal, sin embargo, solo encontramos diferencias estadísticamente significativas al analizar la corteza frontal no motora en pacientes con DLFT-U. En el eje "y" de cada parcela se mide la densidad óptica en unidades arbitrarias. Las muestras de los controles sanos se representan en blanco, las muestras de ELA en negro y las de DLFT\_U en gris. \* valor  $p < 0.05$ , \*\* valor  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

## 4.5 RESULTADO ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO EN SUERO PARA LAS PROTEINAS SELENBP1 Y NAGK

Entre las cinco proteínas (SELENBP1, PIN-1, CACYBP, NAGK y S100A11), no descritas previamente asociadas a la ELA y seleccionadas en este estudio para realizar las validaciones por Western blot, escogimos dos para realizar un análisis inmunoenzimático en suero de sujetos con ELA versus controles sanos, de cara a proponerlas como posibles biomarcadores de ELA. Las proteínas escogidas fueron SELENBP1 por su regulación específica por región y enfermedad y NAGK por su implicación en procesos biológicos asociados a la ELA. Sin embargo, en dichos análisis no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de NAGK y SELENBP1 en suero de pacientes con ELA respecto a controles sanos (Figuras 15 y 16).



Figuras 15 y 16:

Validación mediante ELISA de las proteínas a biomarcadores séricos: Los gráficos muestran los resultados para NAGK y SELENBP1 utilizando grupo control (n=46) y ELA (n=29). Los p-values fueron calculados mediante la t de student.

El diseño experimental del estudio fue concebido para realizar un análisis proteómico exhaustivo de la médula espinal de pacientes con ELA con el objetivo de definir nuevos potenciales biomarcadores de diagnóstico y pronóstico de la enfermedad. Paralelamente, se ha perseguido como segundo objetivo, mejorar el conocimiento sobre la fisiopatogenia de las tardopatías (TDP43-patías) analizando la expresión proteica en tejido postmortem en diferentes regiones del SNC en dos enfermedades con depósito de TDP43, como son la ELA-TP43 y la DLFT-U, versus donantes control sin enfermedad neurodegenerativa.

## 5.1 RASGOS FISIOPATOLÓGICOS COMUNES ENTRE LA ELA Y DLFT-U

La ELA y la DLFT-U comparten aspectos clínicos, características anatomopatológicas, mutaciones genéticas y alteraciones en las vías de señalización celular que conducen a la neurodegeneración. Debido a ello, a menudo se presentan como los dos extremos clínicos de un mismo espectro patogénico. Este estudio pretende contribuir a lograr una mejor comprensión de los mecanismos patogénicos superpuestos y diferenciados en cada una de estas enfermedades. Para conseguir este objetivo, el estudio incluyó, además de un análisis a gran escala de las proteínas expresadas en el asta anterior de los pacientes con ELA y DLFT-U medido mediante proteómica diferencial, un análisis adicional mediante una segunda técnica inmunohistoquímica, con el fin de corroborar dichos resultados, no solo en el asta anterior, sino también en la corteza frontal no motora de ambas enfermedades, es decir, en las dos regiones objetivo de dichas tardopatías. Esta segunda técnica consistió en la cuantificación de las proteínas de interés mediante técnicas de inmunodetección (Western blot).

Se plantea la hipótesis de que los cambios observados en la expresión de las proteínas en el asta anterior de la médula espinal de los pacientes con ELA, los cuales también se detectaron en los pacientes con DLFT-U, sin clínica de neurona motora asociada, podrían ser el reflejo de alteraciones neuropatológicas preclínicas, siendo indicativas de la existencia de mecanismos primarios implicados en las primeras etapas de desarrollo de las tardopatías, incluso previas al depósito de TDP43. Así mismo, la idea de analizar también la expresión de dichas proteínas en la corteza frontal no motora se concibió con la intención de analizar la implicación regional de las mismas, es decir,

valorar si la presencia de cambios en la corteza frontal no motora en sujetos con ELA, podría derivar en el futuro desarrollo de DFT en dichos pacientes.

Los datos proteómicos cuantitativos obtenidos, sugieren la existencia de un daño más intenso en la médula espinal de los pacientes con ELA, dado que se observó que 281 proteínas presentaban una regulación alterada estadísticamente significativa en el asta anterior de la médula espinal de los pacientes con ELA en comparación con el tejido postmortem de los sujetos control sin enfermedad neurodegenerativa, mientras que solo 52 proteínas presentaban una regulación diferenciada significativa en los pacientes con DLFT-U versus controles (figuras 7 y 8). De estas 52 proteínas, 32 (más del 60 %), eran comunes con las proteínas descritas en los casos de ELA, indicando la existencia de un espectro de regulación diferencial común en esta región del SNC en ambas enfermedades (figura 6, tabla 10).

## 5.2 BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES DE ELA

Inicialmente, se adoptó un enfoque basado en evaluar la solidez de los datos proteómicos obtenidos en el estudio, comparando nuestros resultados con los datos publicados en la literatura. Esta comparación confirmó entre el grupo de proteínas diferencialmente desreguladas en los pacientes con ELA, la presencia de 14 proteínas que habían sido descritas previamente como relevantes en el contexto de la ELA (Tabla 11). Entre estas proteínas se encontraron algunos de los candidatos a biomarcadores mejor caracterizados para la ELA, como los neurofilamentos de cadenas de polipéptidos pesadas y medianas (Gonclaves M, Amyotroph Lateral SclerFrontotemporalDegener, 2017), la cistatina C (Wilson ME, PLoS ONE, 2010) o la SOD1 (Rosen DR, Nature, 1993), lo que corroboró la calidad de nuestros datos y respaldó la fiabilidad de las nuevas observaciones descritas en este trabajo.

En la búsqueda de candidatos como posible biomarcador de ELA, se seleccionaron para su validación por WB; por un lado, un grupo de proteínas descritas ya en estudios previos como posibles proteínas alteradas en sujetos con ELA (LGALS3, TTR, S100A6 y ROCK2) con el fin de reforzar el conocimiento existente y la literatura relacionada con las mismas (Zhou, JProteomeRes,2010), (Ranganatha, JNeurochem, 2005), (Botelho, JBiolChem,2012), (Conti A, BiochimBiophysActa, 2014). Y, por otro lado, se seleccionaron cinco proteínas (SELENBP1, Pin1, CACYBP, NAGK y S100A11) no relacionadas anteriormente con la ELA, pero que presentaban una desregulación significativa en el análisis proteómico diferencial de los pacientes con ELA respecto a los controles sin enfermedad neurodegenerativa.

Además, aunque estas proteínas no se hubiesen relacionado previamente con ELA, sí que encontramos descrita su relación con algún proceso biológico relacionado a su vez con la fisiopatogenia de la ELA, lo cual se irá exponiendo y detallando de forma individual para cada una de dichas proteínas, a lo largo de la discusión.

Por lo tanto, en total, conformaban un grupo de 9 proteínas, que analizamos por WB tanto en asta anterior como en corteza frontal motora de ambas enfermedades:

**Tabla 12: Proteínas analizadas por WB en asta anterior y corteza frontal no motora de sujetos con ELA y DLFT-U**

<b>Proteínas analizadas por WB</b>
Galectina-3 (LGALS3)
Prealbúmina (TTR)
Proteína S100-A6 (S100A6)
Proteína cinasa asociada a la Rho 2 (ROCK 2)
Metanotiol oxidasa (SELENBP1)
Peptidil-prolil cis-trans-isomerasa de unión a NIMA 1 (Pin1)
Proteína fijadora de calciclinas (CACYPB)
N-acetilglucosamina (NAGK)
Proteína S100-A11 (S100A11)

Tras dicho análisis de inmunodetección, las agrupamos en función de si presentaban cambios de regulación asociados específicamente a la región (asta anterior o corteza frontal no motora) a la enfermedad (ELA o DLFT-U) ó a ninguno de ellos, clasificándolas por lo tanto en los siguientes subgrupos:

- Proteínas con regulación específica por región y enfermedad: Cuando se encuentran alteradas únicamente en asta anterior de los pacientes con ELA o en la corteza frontal no motora de sujetos con DLFT-U
- Proteínas con regulación específica por enfermedad en ELA: Cuando se encuentran alteradas en los sujetos con ELA ya sea en asta anterior de la médula espinal como en corteza frontal no motora, pero no presentan cambios en ninguna de las regiones en DLFT-U.
- Proteínas sin regulación específica por región o enfermedad: Cuando no se observa un cambio de alteración de expresión concreto exclusivo en una de las dos enfermedades o regiones.

## 5.2.A PROTEÍNAS CON REGULACIÓN ESPECÍFICA POR REGIÓN Y ENFERMEDAD: LGALS3 Y SELENBP1.

Se observaron patrones de regulación específicos por región y enfermedad en el caso de las proteínas LGALS3 y SELENBP1 (figura 10). Mediante Western Blot pudimos validar claramente la regulación al alza de ambas proteínas en la médula espinal de los pacientes con ELA, sin observar cambios en su expresión en la misma región en los pacientes con DLFT-U. Así mismo, se detectó una importante regulación al alza de ambas proteínas en la corteza frontal no motora, en este caso exclusivamente en los pacientes con DLFT-U, sin observarse cambios significativos en los pacientes con ELA. Estos hallazgos podrían sugerir que las proteínas LGALS3 y SELENBP1 desempeñan un papel directo en el daño neuronal, dado que se regulan al alza en las zonas afectadas en cada enfermedad concreta, pero no en las zonas presintomáticas. Por lo tanto, estas dos proteínas, se podrían plantear no solo como biomarcador de enfermedad, sino también como posible diana terapéutica.

La LGALS3 es una proteína de fijación de beta-galactosidasa que se expresa en casi todos los tipos de células y que participa en varias funciones fisiológicas, como la activación del sistema inmune y la apoptosis (Brittoli A, Immunol Lett, 2018) (Diao B, Oncol Lett, 2018). Se ha demostrado que la LGALS3 muestra patrones de expresión alterados en distintas enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer (Wang X, Am J Alzheimers Dis Other Demen, 2015), la enfermedad de Huntington (Siew JJ, Nat Commun, 2019) y la ELA (Ashraf GM, Front Neurosci. 2018). Se han observado niveles elevados de LGALS3 en estudios proteómicos anteriores llevados a cabo sobre el LCR de pacientes con ELA, donde se propuso como potencial biomarcador para la ELA (Zhou JI, J Proteome Res. 2010) (Yan J, Chin Med J Engl, 2016). Recientemente Zubiri et al, publicaron un trabajo donde lo proponen como biomarcador para estratificación de la progresión de la enfermedad (Zubiri I, MolNeurodegener, 2018). Hasta la fecha, no se había relacionado dicha proteína con la DLFT-U.

En 2005 Glatt et al describieron que la expresión de SELENBP1 se encuentra muy aumentada en el tejido postmortem de pacientes con esquizofrenia y deterioro cognitivo (Glatt SJ, Proc Natl Acad Sci USA, 2005). Recientemente se ha publicado un estudio en el que se presenta un mapeo proteómico exhaustivo de corteza frontal postmortem y describen las diferencias proteicas a lo largo del espectro de la ELA-DLFT-U. En dicho estudio presentan SELENBP1 como proteína central en los procesos homeostáticos, y la encuentran diferencialmente regulada entre los controles y los pacientes con ELA, ELA-DLFT-U y DLFT-U (Umoh ME, EMBO Mol Med, 2018).



Este es el único estudio que, hasta la fecha, ha descrito evidencias directas de la participación de la proteína SELENBP1 en ELA. Por otro lado, algunos estudios han descrito la existencia de una relación entre los niveles elevados de selenio y ELA (Mandrioli, Neurodegener Dis, 2017), y otros han observado la implicación de SELENBP1 en la reducción de los niveles de selenio libre que se encuentra disponible para su incorporación en las selenoproteínas (Anouar.Y, Free Radic Biol Med, 2018). Por lo tanto, se podría plantear, que la proteína SELENBP1 podría desempeñar un papel en la neuroprotección mediante dicha reducción de niveles de selenio libre. Teniendo en cuenta nuestros hallazgos, en los que encontramos una regulación específica por región y enfermedad para esta proteína, y la literatura descrita, consideramos que la SELENBP1 podría ser un potencial biomarcador de ELA o de tardopatía, por lo que decidimos analizar su presencia en suero de sujetos con ELA versus controles sin enfermedad neurodegenerativa. En dicho análisis no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de SELENBP1 en suero de pacientes con ELA respecto a controles sanos (figura 16), sin embargo, consideramos que son necesarios estudios más exhaustivos, como un análisis adicional en LCR, ya que es más fácil encontrar un reflejo de las alteraciones moleculares de médula en este fluido que en sangre. No obstante, consideramos que era importante validarlo también en suero ya que es mucho más práctico un biomarcador sérico que en LCR.

## 5.2.B PROTEÍNAS CON REGULACIÓN ESPECÍFICA POR ENFERMEDAD: TTR, S100A6, S100A11 Y PIN1.

Las proteínas TTR, S100A11, S100A6 y Pin1 mostraron una expresión diferencial exclusivamente en ELA, sin observarse cambios en los pacientes con DLFT-U. Las proteínas TTR, S100A11 y S100A6 presentaron una significativa regulación al alza en el asta anterior en los pacientes con ELA y una ausencia de cambios relevantes en corteza frontal no motora en pacientes con ELA. La PIN1 se encontró infraexpresada tanto en asta anterior de la médula espinal como en corteza frontal no motora, exclusivamente en los pacientes con ELA (figura 10).

La TTR es un tetrámero implicado en el transporte sanguíneo de retinol y tiroxina. Se ha propuesto como un potencial biomarcador de la ELA en el LCR (Ryberg.H, MuscleNerve, 2010), y a pesar de que el papel de la TTR en el SNC sigue estando poco estudiado, parece desempeñar un papel clave en la regeneración de los nervios y en el crecimiento neurítico/axonal (Alshehri, JNeuroendocrinol, 2015).

Según estudios anteriores, las neuronas motoras sintetizan y secretan TTR, pudiendo desempeñar así un papel de factor neuroprotector en la Enfermedad de Alzheimer (Choi, JNeurosci, 2007) y el accidente cerebrovascular (Gomes.JR, CellDeathDiffer, 2016), si bien no queda claro si se trata de un proceso dirigido o reactivo al propio insulto cerebral. Los elevados niveles de TTR encontrados en nuestro estudio podrían estar relacionados con una activación de los mecanismos regeneradores como respuesta ante el daño causado por la ELA, apoyando así el papel de la TTR como potencial biomarcador de la ELA.

Las proteínas S100 regulan procesos intracelulares como el crecimiento, transcripción y diferenciación celular (Donato R, CellMolLifeSci. 2017). Las isoformas S100B, S100A6 y S100A11 están coreguladas y colocalizadas en células de astrocitoma U373 (Deloulme, J Biol Chem,2000). Las proteínas S100 se han relacionado previamente con la formación de fibrillas amiloides y concretamente la proteína S100B se ha visto estrechamente relacionada con la Enfermedad de Alzheimer (Heizmann, FrontBiosci, 2002). Se ha descrito un papel neuroprotector en el ictus isquémico de la proteína S100A11, la cual protege de la apoptosis celular mediante la inhibición de la traslocación nuclear ANXA1 inducida por privación y reoxigenación de oxígeno-glucosa (OGD/R) (XiaQ, Cell Death Dis ,2018). La regulación al alza de la proteína S100A6 se ha relacionado con un aumento en la agregación de SOD-1 (Hoyaux, BiochimBiophysActa, 2000). Esta proteína también se ha encontrado regulada al alza en un modelo murino de SOD-1 en el que se observó una sobreexpresión de los astrocitos en el asta anterior de la médula espinal (Hoyaux, JNeuropatholExpNeurol, 2002). Los datos disponibles hasta la fecha apuntan a que la proteína S100A6 en el campo de la neurodegeneración podría ser específica de la ELA, ya que no se ha encontrado asociada a otras enfermedades neurodegenerativas, lo cual supone una valiosa característica para su posible uso como biomarcador diagnóstico (Botelho, JBiolChem, 2012).

En el proceso de validación mediante WB de la proteína Pin1, se observó una significativa regulación a la baja en el asta anterior en los pacientes con ELA y una tendencia a la regulación a la baja en los pacientes con DLFT-U, pero sin cambios estadísticamente significativos en este segundo grupo. Se observaron también estos mismos resultados en la corteza frontal no motora. La proteína Pin1 se encuentra sobreexpresada en las neuronas y está implicada en la fosforilación de los neurofilamentos. La fosforilación aberrante de los neurofilamentos conduce a su acumulación, lo cual parece desempeñar un papel importante en distintas enfermedades neurodegenerativas, como ELA, Enfermedad de Alzheimer y Demencia frontotemporal con parkinsonismo asociada al cromosoma 17 (DFTP-17) (Rudrabhatla, J Neurosci, 2009).

Se ha descrito que Pin1 interactúa con proteínas citoesqueléticas neuronales como tau, precursor de proteína amiloide-beta, alfa-sinucleína y neurofilamentos, mediante fosforilación de las mismas, en cambio, hasta la fecha no se ha relacionado directamente con la fosforilación de TDP43 (Rudrabhatla, J Alzheimer Dis, 2010) Consideremos que la proteína Pin1 parece ser una potencial candidata como biomarcador de neurodegeneración, con una participación especialmente importante en la agregación y acumulación de proteínas través de la fosforilación de las mismas. No obstante, para desarrollar esta idea de manera más exhaustiva debe realizarse un estudio más amplio en el que se consideren cohortes más grandes de pacientes y se analicen distintas regiones del SNC para diferentes enfermedades neurodegenerativas.

### 5.2.C PROTEÍNAS SIN REGULACIÓN ESPECÍFICA POR REGIÓN O ENFERMEDAD: CACYBP, ROCK2 Y NAGK

Las proteínas CACYBP, ROCK2 Y NAGK presentaron un perfil de regulación que no pareció ser específico por región ni por enfermedad (figura 10). En el estudio proteómico observamos que la CACYBP estaba regulada a la baja en la médula espinal de los pacientes con ELA y la validación mediante Western Blot confirmó dicho resultado, pero, curiosamente, mostró una tendencia opuesta cuando se analizó la corteza frontal no motora, revelando en este caso una regulación al alza muy significativa en ambas enfermedades. Hasta la fecha no disponemos de datos que relacionen la proteína CACYBP con la ELA, no obstante, presenta muchos vínculos indirectos con otras enfermedades neurodegenerativas, como la Enfermedad de Huntington (Czeredys, FrontMolNeurosci, 2013), la Enfermedad de Parkinson y la Enfermedad de Alzheimer (Wasik U, NeurobiolAging, 2013). Además, se sabe que la CACYBP está implicada en la dinámica citoesquelética y en la regulación de la respuesta transcripcional en las neuronas (Topolska-Woś, Biochim Biophys Acta, 2016).

La proteína ROCK2, se validó regulada a la baja en la médula espinal en ambos síndromes, sin embargo, en la corteza frontal no motora únicamente se encontró infraexpresada en los casos de ELA (figura 10). Existen evidencias de que las Rho quinasas podrían estar relacionadas con la ELA y, de hecho, en un modelo murino de SOD1 (G93A) de ELA se describió que la inhibición de la Rho cinasa tenía un efecto neuroprotector (Tönges.L, Glia, 2014). Además, la expresión anómala de ROCK2 se ha asociado con niveles elevados de expresión de la proteína H de unión a la miosina en la ELA (Conti.A, BiochimBiophysActa, 2014). Por ello, estas proteínas son posibles candidatas para futuros estudios y análisis adicionales. Con nuestros hallazgos aportamos más evidencias de la regulación a la baja de la proteína ROCK2 en la ELA y la

DLFT-U, especialmente en la médula espinal, pero también en la corteza frontal no motora en los pacientes con ELA.

La proteína NAGK se validó sobreexpresada en asta anterior de la médula espinal tanto de pacientes con ELA como DLFT-U, sin embargo, en corteza frontal no motora se observó infraexpresada únicamente en ELA (figura 10). La proteína NAGK juega un papel relevante en la dendritogénesis, crecimiento axonal y desarrollo neuronal (Ariful I, MolCells, 2015). Las redes de interacción entre proteínas muestran una relación directa de ésta, con la proteína chitotriosidasa (Chit1) (figura 17), la cual ha sido propuesta como posible biomarcador de enfermedad en ELA por diferentes grupos de estudio, incluido el nuestro, al encontrarse niveles significativamente elevados en LCR de pacientes con ELA respecto a controles (Varghese, Proteomics, 2013), (Martinez-Merino, NeurodegenerDis, 2018). Recientemente, Steinacker et al, objetivaron niveles elevados de la proteína Chit1 en asta anterior de pacientes con ELA, colocalizada junto con otros marcadores de microglia (IBA1) y macrófagos (CD68), pudiendo tener por lo tanto, un papel específico en la neuroinflamación (Steinacker P, J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2018). Se podría concluir de estos estudios, que el hallazgo de niveles elevados de la actividad de la Chit1 en LCR de pacientes con ELA respecto a controles, podría ser un reflejo de la activación de la microglía.

Teniendo en cuenta el potencial papel como biomarcador de la proteína CHIT1 y su relación funcional directa con la NAGK, nos planteamos la posibilidad de la proteína NAGK como otro potencial biomarcador de ELA, y es por ello que decidimos analizar su presencia en suero de sujetos con ELA versus controles sin enfermedad neurodegenerativa. En dicho análisis inmunohistoquímico no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de la proteína NAGK respecto a los controles (figura 15), sin embargo, consideramos que la proteína tiene potencial como posible biomarcador, pero para poder desarrollar esta hipótesis, son necesarios estudios más exhaustivos como por ejemplo su análisis en LCR de sujetos con ELA. Asimismo, teniendo en cuenta los datos obtenidos en nuestro estudio, inferimos la posibilidad de que la regulación al alza de la proteína NAGK en asta anterior, podría estar directamente implicada en la patogénesis de las tardopatías.

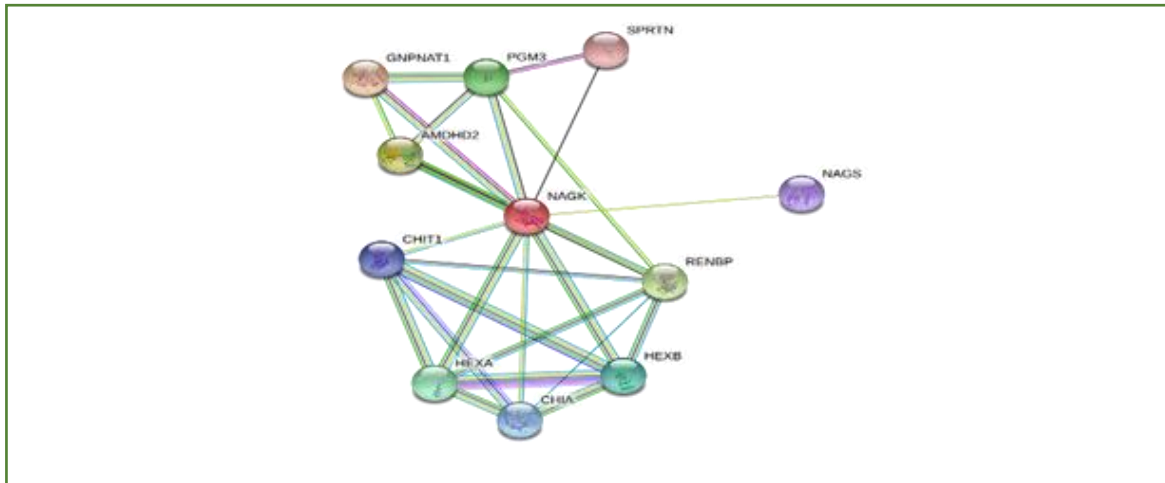


Figura 17: Interacción entre proteína NAGK y CHIT1 según estudios bioinformáticos in silico (string).

### 5.3 INTERACTOMAS DE PROTEÍNAS

La representación de redes de interacción funcionales de proteínas mediante herramientas bioinformáticas permite resaltar conexiones y mostrar vías funcionales que involucran al proteoma desregulado, permitiendo identificar aquellas proteínas potencialmente relevantes. Así, los interactomas de proteínas obtenidos de nuestro estudio, nos permitieron resaltar el papel de las proteínas cinasas en los procesos de muerte neuronal y el papel de las prohibitinas (PHB) como sensor de alteración mitocondrial.

#### 5.3.A CONTRIBUCIÓN DE LAS PROTEÍNAS CINASAS EN LA MUERTE CELULAR

Los interactomas funcionales de proteínas desreguladas en ELA versus controles sin enfermedad neurodegenerativa, mostraron su implicación en la muerte celular y la regulación de la señalización de supervivencia, y en dichos interactomas destacó el papel de las proteínas cinasas ERK y Akt (figura 12). Existen evidencias de que se produce una regulación anómala de las proteínas cinasas en varias enfermedades neurodegenerativas, incluida la ELA, en las que la alteración de las actividades y de los niveles de cinasas específicas provoca una fosforilación anómala y sucesos aberrantes que podrían contribuir a la muerte neuronal (Wagey, ProgDrugRes. 1998). De hecho, el único fármaco aprobado en España para el tratamiento de la ELA, el Riluzole, es un

inhibidor de la proteína cinasa CK1 (Bissaro M, ChemMedChem, 2018) Es por ello, que decidimos testar un panel de proteínas kinasas (AKT, FAK, MEK ERK) (figura 13) y su estado de activación (si estaban fosforiladas o no), pertenecientes a 2 vías canónicas de señalización:

-Vía 1: FAK/PI3K/AKT

- Vía 2: MAPK/ERK.

Los resultados obtenidos indicaron que, en función de la región, se producen alteraciones en una ruta u otra. En asta anterior de la médula espinal de sujetos con ELA observamos un descenso de componentes de la vía 1 (AKT, pAKT, FAK, pFAK), lo cual podría ser una alteración temprana en las tardopatías, ya que también se encontraron disminuidas en asta anterior de la médula espinal de los sujetos con DLFT-U. Sin embargo, en asta anterior de la médula espinal no observamos alteraciones de las kinasas de la vía 2.

Por otro lado, en corteza frontal no motora observamos un aumento de las kinasas de la vía 2 (MEK, pMEK, pERK), tanto en ELA como en DLFT-U, aunque de forma más acusada en este segundo grupo, por lo que también parecen ser alteraciones tempranas en las tardopatías. En esta región, observamos, además, un descenso en algunos componentes de la vía 1 (AKT, FAK y pFAK) solo en DLFT-U. Todo esto parece indicar que existen alteraciones tempranas en vías de señalización diferentes en función de la región afectada.

La vía 1 (FAK/PI3K/AKT) participa en el efecto protector mediado por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés) que reduce la muerte de las neuronas motoras mediada por la SOD1 mutante y mejora la supervivencia de las neuronas motoras (Yin.X, MolCellNeurosci, 2015), lo que sugiere que la vía 1 desempeña un papel fundamental en la supervivencia de las neuronas motoras (Koh.SH, Toxicology, 2005). Además, la vía 1 podría estar implicada en la regulación del mecanismo de excitotoxicidad inducido por el glutamato. Este mecanismo no está totalmente aclarado, sin embargo, existen evidencias de que se produce una mediación a través de la inhibición de FAK/PI3K/AKT (Shah.SA, CellDeathDis, 2014). Los receptores de glutamato actúan a través de muchas vías de señalización intracelular (Battaglia.G, CurrOpinPharmacol, 2018) y se han propuesto como buenos objetivos potenciales del tratamiento para la ELA debido al papel clave que desempeña el glutamato en el desarrollo neuronal y en la plasticidad sináptica.

### 5.3.B COMPLEJO PROHIBITINA COMO SENSOR DE ALTERACIÓN MITOCONDRIAL

Los interactomas proteicos mostraron también vías implicadas en el deterioro mitocondrial y metabólico (Figura 11). Teniendo en cuenta lo anterior, y dado que en nuestro estudio proteómico se observó que la proteína prohibitina 2 (PHB2) estaba regulada a la baja en los pacientes con ELA, consideramos interesante estudiar con más detalle la regulación del complejo prohibitina, un receptor crucial de la mitofagia y uno de los ligandos de interacción con la TDP-43 en la mitocondria (Davis.SA, NeurosciLett, 2018). Analizamos el complejo PHB como probable conductor de desequilibrio mitocondrial, ya que un número creciente de estudios están describiendo evidencias funcionales claras del deterioro de la cadena respiratoria en la ELA, así como en otros trastornos neurodegenerativos (Vehviläinen.P, Front Cell Neurosci, 2014). Las PHB desempeñan un papel importante en el ensamblaje de las subunidades de los complejos de las cadenas respiratorias mitocondriales (Davis.SA, NeurosciLett, 2018).

Además, el complejo PHB se modula de manera diferenciada en distintos tipos de demencia (Lachén-Montes.M, Sci Rep, 2017). Existen dos proteínas PHB que se encuentran formando un complejo en la membrana interna de la mitocondria, la prohibitina 1 (PHB1) y la prohibitina 2 (PHB2). En nuestro estudio seleccionamos ambas proteínas para su validación mediante Western Blot, tanto en asta anterior como en corteza frontal no motora, en los sujetos con ELA y DLFT-U.

Dicho análisis demostró una regulación significativa a la baja de la PHB1 y una regulación muy significativa a la baja de la PHB2 en la médula espinal en ambas enfermedades (Figura 14). Curiosamente, estas proteínas solo estaban desreguladas en la corteza frontal no motora de los pacientes con DLFT-U.

Este hallazgo podría sugerir que el daño mitocondrial ocurre de forma precoz en estas enfermedades neurodegenerativas, y que en las etapas tempranas de la DLFT-U, en las que no todavía no se manifiestan síntomas motores, ya se están produciendo alteraciones moleculares a nivel mitocondrial en la médula espinal.

1. Nuestro estudio corrobora el solapamiento patogénico entre la ELA y la DLFT-U, dado que comparten modificaciones en la expresión proteica incluso en áreas no sintomáticas o presintomáticas. Estos datos podrían indicar la existencia de una serie de mecanismos patógenos primarios responsables del desarrollo inicial del daño neuronal en las tardopatías.
2. Respaldamos la participación de determinadas proteínas, asociadas previamente a la ELA, como son las proteínas LGALS3, TTR, S100A6 y ROCK2.
3. Describimos la implicación de nuevas proteínas relacionadas con la ELA, que no se habían descrito previamente, como son las proteínas SELENBP1, PIN-1, CACYBP, S100A11 y NAGK.
4. No hemos conseguido validar la utilidad de la medición de la NAGK y SELENBP1 en suero de pacientes como biomarcador diagnóstico de la ELA, no obstante, consideramos que deben realizarse más experimentos específicos para evaluar la función que desempeñan estas proteínas en las tardopatías.
5. Se describen y analizan en detalle el deterioro mitocondrial y la regulación de la vía de señalización celular a fin de proporcionar nuevas perspectivas sobre la participación y la importancia del complejo PHB en el deterioro mitocondrial y el interés de los sucesos de señalización mediados por la vía FAK/PI3K/AKT en la muerte celular y la supervivencia en la ELA y la DLFT-U.



**AD:** Autosómico dominante

**AR:** Autosómico recesivo

**ARN:** Acido ribonucleico

**BHE:** Barrera hemato-encefálica.

**CK:** Creatina quinasa sérica

**DFT:** Demencia frontotemporal

**ELA:** Esclerosis Lateral Amiotrófica.

**ELAf:** ELA familiar

**ELAs:** ELA esporádica

**FA:** Fracción de anisotropía

**FDA:** Food and Drug Administration

**FPs:** Potenciales de Fasciculación.

**GAL3:** Galectina 3.

**H-E:** Hematoxilina Eosina.

**H-RMN:** Resonancia magnética nuclear de protones.

**IBA 2:** Molécula adaptadora de la unión al calcio ionizada tipo 2.

**IGF-1:** factor de crecimiento de insulina like tipo 1.

**IL:** Interleucina.

**IN:** Índice neurofisiológico

**LCR:** Líquido cefalorraquídeo.

**MCSF:** Factor estimulante de colonias de macrófagos

**MUNE:** Estimación del número de unidades motoras

**NAA:** N-Acetilaspártato.

**NFL:** Neurofilamento

**PAMC:** Amplitud del potencial de acción muscular compuesto.

**PET:** Tomografía por emisión de positrones.

**PHB:** Prohibitinas.

**PTHA:** Hematoxilina ácida fosfotúngica.

**pNFH:** Neurofilamentofosforilado

**RE:** Retículo endoplasmático

**RBP:** RNA binding proteins.

**RM:** Resonancia Magnética.

**SNC:** Sistema nervioso central.

**TNF:** Factor de necrosis tumoral.

**TTR:** Transtirretina.

## 8

## BIBLIOGRAFÍA

### A

- Acary Souza Bulle Oliveira, Roberto Dias Batista Pereira. Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS): Three letters that change the people's life. *ArqNeuropsiquiatr.* 2009;67 (3):750-782.
- Adeline SL, Rosa R, BL Miller. Frontotemporal Demencia: a bridge between dementia and neuromuscular disease. *Ann N Y Acad Sci* 2015; 1338 (1): 71-93.
- Adriaan D de Jongh, Van Eijk RPA, Van den Berg LH. Evidence for a multimodal effect of riluzole in patients with ALS? *J NeurolNeurosurg Psychiatry.* 2019 May 7.
- Agar J, Durham H. Relevance of oxidative injury in the pathogenesis of motor neuron diseases. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord.* 2003; 4 (4): 232-242.
- Alan ER, Elisa M, Adrian W, Javier SS, Sara R, JRaphael G et al. A hexanucleotide repeat expansión in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron* 2011; 72(2): 257-268.
- Alexianu.ME.; Ho.BK.; Mohamed.AH.; La Bella.V.; Smith.RG.; Appel. SH. The role of calcium-binding proteins in selectivemotoneuronvulnerability in amyotrophic lateral sclerosis.*Ann Neurol.* 1994, 36(6):846-58.
- Alonso R, Pisa D, Marina AI, Morato E, Rábano A, Rodal I, Carrasco L. Evidence for Fungal Infection in Cerebrospinal Fluid and Brain Tissue from Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Int J Biol Sci.* 2015; 11(5):546-558.
- Alshehri B.; D'Souza.DG.; Lee.JY.; Petratos.S.; Richardson.SJ. The diversity of mechanisms influenced by transthyretin in neurobiology: development, disease and endocrine disruption.*J Neuroendocrinol.* 2015, 27(5):303-23.
- Alsultan.AA.; Waller.R.; Heath.PR.; Kirby.J. The genetics of amyotrophic lateral sclerosis: current insights. *Degener Neurol Neuromuscul Dis.*2016, 6:49-64.
- Ammar Al-Chalabi, Andrea Clavo, Adriano Chio, Shuna Colville, Cathy M Ellis, Orla Hardinam et al. Analysis of amyotrophic lateral sclerosis as a multistep process: a population-based modelling study. *Lancet Neurol.* 2014. Nov 13 (11): 1108-1113.

- Ammar Al-Chalabi, Hardiman O, Kiernan MC, Chio A, Rix-Brooks B, Van der Berg LH. Amyotrophic lateral sclerosis: moving towards a new classification system. *Lancet Neurol*. 2016. Oct; 15 (11): 1182-94.
- Ammar Al-Chalabi, Pamela J Shaw, Carolyn A Young, Karen E Morrison, Caroline Murphy, Mare Thornhill et al. Protocol for a double-blind randomised placebo-controlled trial of lithium carbonate in patients with Amyotrophic lateral Sclerosis (LiCALS). *BMJ Neurol*. 2011; 11:11.
- Andrés-Benito P, Dominguez R, Colomina MJ, Llorens F, Povedano M, Ferrer I. YKL40 in sporadic amyotrophic lateral sclerosis: cerebrospinal fluid levels as a prognosis marker of disease progression. *Aging (Albany NY)*. 2018 sept 13; 10 (9): 2367-2382.
- Andrew P Tosolini, James N Sleight. Motor neuron gene therapy: Lessons from spinal muscular atrophy for amyotrophic lateral sclerosis. *Front Mol Neurosci*. 2017; 10:45.
- Anouar Y.; Lihrmann.I.; Falluel-Morel.A.; Boukhza. L.Selenoprotein T is a key player in ER proteostasis, endocrine homeostasis and neuroprotection. *Free Radic Biol Med*. 2018 Nov 1;127:145-152.
- Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, et al. TDP43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006; 351: 602-611.
- Ariful Islam, Sharif SR, Lee H, Moon IS. N-Acetyl-D-Glucosamine Kinase Promotes the Axonal Growth of Developing Neurons. *Mol Cells*. 2015;38(10):876–885.
- Ashraf GM.; Baeesa.SS. Investigation of Gal-3 Expression Pattern in Serum and Cerebrospinal Fluid of Patients Suffering From Neurodegenerative Disorders. *Front Neurosci*. 2018 Jun 29;12:430.
- Aslam B, Basit M, Nisar MA, Khurshid M, Rasool MH. Proteomics: Technologies and Their Applications. *J Chromatogr Sci*. 2017;55(2):182–196.

## B

- Bali T, Self W, Liu J, Siddique T, Wang LH, Bird TD et al. Defining SOD1 ALS natural history to guide therapeutic clinical trial design. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2017; 88:99-105.
- Banack SA, Cox PA. Creating a Simian Model of Guam ALS/PDC which reflects Camorro lifetime BMAA exposures. *Neurotox Res*. 2018 Jan; 33 (1): 24-32.
- Battaglia.G.; Bruno.V. Metabotropic glutamate receptor involvement in the pathophysiology of amyotrophic lateral sclerosis: new potential drug targets for therapeutic applications. *Curr Opin Pharmacol*. 2018 Feb;38:65-71.
- Bell JE, Alafuzoff I, Al-Sarraj S, Arzberger T, Bogdanovic, N, Budka H, Kretschmar H. Management of a twenty-first century brain bank: experience in the BrainNet Europe consortium. *Acta Neuropathol*. 2008; 115(5), 497-507.

- Benmouna K, Milants C, Wang FC. Correlations between MUNIX and adapted multiple point stimulation MUNE methods. *Clin Neurophysiol.* 2018;129(2):341–344.
- Bhattacharya R, Harvey RA, Abraham K, Rosen J, Mehta P. Amyotrophic Lateral Sclerosis among patients with a Medicare Advantage prescription drug plan; prevalence, survival and patient characteristics. *AmyotrophLateralSclerFrontotemporalDegener.* 2019 May: 20 (3-4), 251-259.
- Bilsland LG, Sahai E, Kelly G, Golding M, Greensmith L, Schiavo G. Deficits in axonal transport precede ALS symptoms in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(47):20523–20528. doi:10.1073/pnas.1006869107
- Birsa N, Bentham MP, Fratta P. Cytoplasmatic functions of TDP43 an FUS and their role in ALS. *Semin Cell Dev Biol.* 2019 Jun 4.
- Bissaro M, Federico S, Salmaso V, Sturlese M, Spalluto G, Moro S. Targeting Protein Kinase CK1δ with Riluzole: Could It Be One of the Possible Missing Bricks to Interpret Its Effect in the Treatment of ALS from a Molecular Point of View?. *ChemMedChem.* 2018;13(24):2601–2605.
- Blasco H, Patin F, Madji Hounoum B, Gordon PH, Vourc'h P, Andres CR et al. Metabolomics in amyotrophic lateral sclerosis: how far can it take us? *Eur J Neurol.* 2016. 23: 447-54.
- Botelho.HM.; Leal.SS.; Cardoso.I.; Yanamandra.K.; Morozova-Roche.LA.; Fritz.G.; Gomes.CM. S100A6 amyloid fibril formation is calcium-modulated and enhances superoxide dismutase-1 (SOD1) aggregation. *J Biol Chem.* 2012, 287(50):42233-42.
- Brittoli A.; Fallarini.S.; Zhang.H.; Pieters.RJ.; Lombardi.G."In vitro" studies on galectin-3 in human natural killer cells. *Immunol Lett.* 2018, 194:4-12.
- Browne SE, Bowling AC, Baik MJ, Gurney M, Brown RH, Beal MF. Metabolic dysfunction in familial, but not sporadic, amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem.* 1998; 71: 281-287.
- Burkhardt C, Neuwirth C, Sommacal A, Andersen PM, Weber M. Is survival improved by the use of NIV and PEG in amyotrophic lateral sclerosis (ALS)? A post-mortem study of 80 ALS patients. *PLoS One.* 2017. May 23; 12(5).
- Butterfield.DA.; Abdul.HM.; Opii.W.; Newman.SF.; Joshi.G.; Ansari.MA.; Sultana.R. Pin1 in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 2006, 98(6):1697-706.

## C

- Cairns.NJ.; Bigio.EH.; Mackenzie.IR.; Neumann.M.; Lee.VM.; Hatanpaa.KJ.; et al. Neuropathologic diagnostic and nosologic criteria for frontotemporal lobar degeneration: Consensus of the Consortium for Frontotemporal Lobar Degeneration. *Acta Neuropathol.* 2007, 114(1):5-22.
- Canosa A, Pagani M, Cistaro A, Montuschi A, Iazzolino B, Fania P et al. 18F-FDG-PET correlates of cognitive impairment in ALS. *Neurology.* 2016; 86:44-9.

- Caroppo P, Camuzat A, Guillot-Noel L, Thomas-Anterion C, Couratier P, Wong TH et al. Defining the spectrum of frontotemporal dementias associated with TARDBP mutations. *NeurolGenet* 2016 May 26; 2(3).
- Chakraborty S. Response to "Metabolomic analysis of serum by (1) H NMR spectroscopy in amyotrophic lateral sclerosis" by Kumar et al. *Clin Chim Acta*. 2010;411(17-18):1382–1383.
- Charcot JM. Sclérose des crodonslatéraux de la moëlleépineièrechez une femme hysteriqueatteinte de contracture permanente des quatremembres. *L'Union Med* 1865;25:451-467.
- Cheah BC, Vucic S, Krishnan AV; Boland RA, Kiernan MC. Neurophysiological index as a biomarker for ALS progression: validity of mixed effects moderls. *Amyotroph Lateral Scler*. 2011; 12:33.8.
- Chen X, Liu X, Lang H, Zhang S, Luo Y, Zhang J. S100 calcium-binding protein A6 promotes epithelial-mesenchymal transition through  $\beta$ -catenin in pancreatic cancer cell line. *PLoS One*. 2015;10(3):e0121319. Published 2015 Mar 23.
- Chio A, Calvo A, Bovio G, Canosa A, Bertuzzo D, Galmozzi F et al. Amyotrophic lateral sclerosis outcome measures and the role of albumin and creatinine: a population-based study. *JAMA Neurol* 2014. 71; 1134-42.
- Chio A, Logroscino G, Traynor BJ, Collins J, Simeone JC, Goldstein LA, White LA. Global Epidemiology of Amyotrophic lateral sclerosis: A Systematic review of the published literature. *Neuroepidemiology*. 2013; 41 (2): 118-130.
- Chio A, Moglia C, Canosa A, et al. Cognitive impairment across ALS clinical stages in a population-based cohort. *Neurology*. 2019;93(10):e984–e994.
- Choi.SH.; Leight.SN.; Lee.VM.; Li.T.; Wong.PC.; Johnson.JA.; Saraiva.MJ.; Sisodia.SS. Accelerated Abeta deposition in APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>deltaE9</sup> mice with hemizygous deletions of TTR (transthyretin). *J Neurosci*. 2007 , 27(26):7006-10
- Chuang HH, Yang CH, Tsay YG, et al. ROCKII Ser1366 phosphorylation reflects the activation status. *Biochem J*. 2012;443(1):145–151.
- Ciervo Y, Ning K, Jun X, Shaw PJ, Mead RJ. Advances, challenges and future directions for stem cell therapy in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Neurodegener*. 2017;12(1):85. Published 2017 Nov 13.
- Collins MA, An J, Hood BL, Conrads TP, Bowser RP, Label Free LC-MS/MS proteomic analysis of cerebrospinal fluid identifies protein/pathway alterations and candidate biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis. *J Proteome Res*. 2015; 14: 4486-501.
- Conti.A.; Riva.N.; Pesca.M.; Iannaccone.S.; Cannistraci.CV.; Corbo.M.; et al. Increased expression of Myosin binding protein H in the skeletal muscle of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Jan;1842(1):99-106

- Couratier P, Corcia P, Lautrette G, Nicol M, Marin B. ALS and frontotemporal dementia belong to a common disease spectrum. *Rev Neurol Paris*. 2017 May; 173(5): 273-279.
- Croft D, Mundo AF, Haw R, Milacic M, Weiser J, Wu G et al. The reactome pathway knowledgebase. *Nucleic Acids Res*. 2014.
- Cui R, Tuo M, Li P, Zhou C. Association between TBK1 mutations and risk of amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal dementia spectrum: a meta-analysis. *Neurol Sci*. 2018 May; 39 (5): 811-820.
- Czeredys.M.; Gruszczynska-Biegala.J.; Schacht.T.; Methner.A.; Kuznicki.J. Expression of genes encoding the calcium signalosome in cellular and transgenic models of Huntington's disease. *Front Mol Neurosci*. 2013, 6:42.

## D

- Davis SA, Itaman S, Khalid-Janney CM, Sherard JA, Dowell JA, Cairns NJ, Gitcho MA. TDP-43 interacts with mitochondrial proteins critical for mitophagy and mitochondrial dynamics. *Neurosci Lett*. 2018 Jun 21;678:8-15.
- De Albuquerque M, Branco LM; Rezende TJ, De Andrade HM, Nucci A, Franca MC. Longitudinal evaluation of cerebral and spinal cord damage in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroimage Clin*. 2017; 14: 269-76.
- De Schaepdryver M, Jeronim A, Gille B, Claeys KG, Herbst V, Brix B et al. Comparison of elevated phosphorylated neurofilament heavy chains in serum and cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2017; 89:367-73.
- Debray S, Race V, Cabbé V, Herdewyn S, Matthijs G, Goris A et al. Frequency of C9orf72 repeat expansions in amyotrophic lateral sclerosis: A belgian cohort study. *Neurobiol Aging* 2013 Dec; 34 (12): 2890.
- Dekker AM, Diekstra FP, Pulit SL, Tazelaar GHP, Van der Spek RA, Van Rheenen W et al. Exome array analysis of rare low frequency variants in amyotrophic lateral sclerosis. *Sci Rep*. 2019 Apr 11; 9(1): 5931.
- Deloulme JC, Assard N, Mbele GO, Mangin C, Kuwano R, Baudier J. S100A6 and S100A11 are specific targets of the calcium- and zinc-binding S100B protein in vivo. *J Biol Chem*. 2000;275(45):35302–35310.
- Di Pietro L, Baranzini M, Berardinelli MG, Lattanzi W, Monforte M, Tasca G, et al. Potential therapeutic targets for ALS: MIR206, MIR208b and MIR409 are modulated during disease progression in the skeletal muscle of patients. *Sci Rep*. 2017; 7: 9538.
- Diao B, Liu Y, Xu GZ, Zhang Y, Xie J, Gong J. The role of galectin-3 in the tumorigenesis and progression of pituitary tumors. *Oncol Lett*. 2018, 15(4):4919-4925

- Disi An, Ryosuke Fujiki, Dylan E Iannitelli, John W Smerdon, ShuvadeepMaity, Matthew F Rose et al. Stem cell-derived cranial and motor neurons reveal proteostatic differences between ALS resistant and sensitive motor neurons. *eLife*. 2019.
- Donato R, Sorci G, Giambanco I. S100A6 protein: functional roles. *Cell Mol Life Sci*. 2017;74(15):2749–2760.
- Dmitry Petrov, Colin Mansfield, Alain Moussy, Olivier Hermine. ALS clinical trials review: 20 years of failure. Are we closer to registering a new treatment? *Front Aging Neurosci*. 2017; 9:68.

## E

- Eisen A; Schulzer M; Macneil M; Pant B; Mark E. Duration of amyotrophic lateral sclerosis age dependent. *MuscleNerve*. 1993; 27-32.
- Ekegren T, Hanrieder J, Aquilonius SM, Bergquist J. Focused proteomics in post-mortem human spinal cord. *J Proteome Res*. 2006; 5(9): 2364-71.
- Elf.K.; Shevchenko.G.; Nygren.I.; Larsson.L.; Bergquist.J.; Askmark.H.; Artemenko.K.; Alterations in muscle proteome of patients diagnosed with amyotrophic lateral sclerosis. *J Proteomics*. 2014, 108:55-64.
- Emanuele D'Amico, Pam Factor-Litvak, Regina M Santella, HiroshiMitsumoto. Clinical perspective of Oxidative Stress in sporadic ALS. *Free RadicBiol Med*. 2013 Jun.
- Emiliano Trias, Sofialbarburu, Romina Barreto-Nuñez, Joel Babdor, Thiago T Maciel, Matthias Guillo et al. Post-paralysis tyrosine kinase inhibition with masitinib brogatesneuroinflammation and slows disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroinflammation*. 2016; 13:17.
- Engelen-Lee J, Blokhuis AM, Spliet WGM, Pasterkamp RJ, Aronica E, Demmers JAA, et al. Proteomic profiling of the spinal cord in ALS: Decreased ATP5D levels suggest synaptic dysfunction in ALS pathogenesis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 2017; 18 (3-4):210-220.
- Ettore Beghi. *Amyotrophic Lateral Scler*. 2011.

## F

- Ferraiuolo L, Kirby J, Grierson AJ, Sendtner M, Shaw PJ. Molecular pathways of motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurol*. 2011;7(11):616–630.
- Ferrari R, Kapogiannis D, Huey ED, Momeni P. FTD and ALS: a tale of two diseases. *Curr Alzheimer Res*. 2011; 8(3):273-294.

- Fialová.L, Svarcová.J, Bartos.A, Ridzon.P, Malbohan.I, Keller.O, Rusina.R.Cerebrospinal fluid and serum antibodies against neurofilaments in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurol*.2010 Apr;17(4):562-6.
- Foggin S, Mesquita-Ribero R, Dajas- Bailador F, Layfield R. Biological significance of microRNA biomarkers in ALS- Innocent bystanders or Disease culprits? *Front Neurol*.2019 Jun 11.
- Franceschini A1, Szklarczyk D, Frankild S, Kuhn M, Simonovic M, Roth A et al. STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic Acids Res*. 2013.

## G

- Gao L, Zhou S, Cai H, Gong Z, Zang D. VEGF levels in CSF and serum in mild ALS patients. *J Neurol Sci*. 2014;346(1-2):216–220.
- García-Redondo A, Dols-Icardo O, Rojas-García R, et al. Analysis of the C9orf72 gene in patients with amyotrophic lateral sclerosis in Spain and different populations worldwide. *Hum Mutat*. 2013;34(1):79–82.
- Geser F, O’Dwyer L, Hardiman O et al. On the development of markers for pathological TDP43 in amyotrophic lateral sclerosis with and without dementia. *Progress in neurobiology*. 2011; 95: 649-662.
- Geser F, Lee VMY, Trojanowski JQ. Amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration: A spectrum of TDP43 proteinopathies. *Neuropathology*. 2010; 30: 103-112.
- Gille B, De Schaepdryver M, Dedeene L, et al. Inflammatory markers in cerebrospinal fluid: independent prognostic biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis?. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2019;90(12):1338–1346.
- Glatt SJ.; Overall.IP.; Kremen.WS.; Corbeil.J.; Sasik.R.; Khanlou.N.; et al. Comparative gene expression analysis of blood and brain provides concurrent validation of SELENBP1 up-regulation in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005.
- Gomes JR.; Nogueira.RS.; Vieira.M.; Santos.SD.; Ferraz-Nogueira.JP.; Relvas.JB.; Saraiva.MJ. Transthyretin provides trophic support via megalin by promoting neurite outgrowth and neuroprotection in cerebral ischemia. *Cell Death Differ*. 2016 Nov 1;23(11):1749-1764
- Gonçalves M, De Carvalho M, Peixoto C, et al. Phosphoneurofilament heavy chain and vascular endothelial growth factor as cerebrospinal fluid biomarkers for ALS. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 2017;18(1-2):134–136.

## H

- Hanrieder J, Ekegren T, Andersson M, Bergquist J. MALDI imaging of post-mortem human spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 2013; 124 (5): 695-707.



- Hardiman O, Van Den Berg LH, Kierman MC. Clinical diagnosis and management of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurol*. 2011; 7: 639-49.
- Hedl TJ, San Gil R, Cheng F, et al. Proteomics Approaches for Biomarker and Drug Target Discovery in ALS and FTD. *Front Neurosci*. 2019;13:548.
- Heizmann CW, Fritz G, Schäfer BW. S100 proteins: structure, functions and pathology. *Front Biosci*. 2002;7:d1356–d1368.
- Hongjun Fu, John Hardy, Karen E Duff. Selective vulnerability in neurodegenerative diseases. *Nat Neurosci*. 2018 Oct; 21 (10): 1350-1358.
- Hoyaux D.; Alao.J.; Fuchs.J.; Kiss.R.; Keller.B.; Heizmann.CW.; Pochet.R.; Frermann.D. S100A6, a calcium- and zinc-binding protein, is overexpressed in SOD1 mutant mice, a model for amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta*. 2000, 1498(2-3):264-72.
- Hoyaux D, Boom A, Van den Bosch L, et al. S100A6 overexpression within astrocytes associated with impaired axons from both ALS mouse model and human patients. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2002;61(8):736–744.
- Huang da W, Sherman BT, Zheng X, Yang J, Imamichi T, Stephens R et al. Extracting biological meaning from large gene lists with DAVID. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2009.Chapter 13, unit 13.11.

## I

- Ina Dervishi, OgeGouztok, Kevin Murman, Mukesh Gautam, Daniel Heller, Eileen Bigio et al. Protein-protein interactions reveal key canonical pathways, upstream regulators, interactome domains, and novel targets in ALS. *Sci Rep*. 2018; 8: 14732.
- Iridoy MO, Zubiri I, Zelaya MV, et al. Neuroanatomical Quantitative Proteomics Reveals Common Pathogenic Biological Routes between Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) and Frontotemporal Dementia (FTD). *Int J Mol Sci*. 2018;20(1):4.
- Iwata NK, Aoki S, Okabe S, Arai N, Terao Y, Kwak S et al. Evaluation of corticospinal tracts in ALS with diffusion tensor MRI and brainstem simulation. *Neurology*. 2009; 70: 528-32.

## J

- Javier Riancho, I.Gonzalo, M.Ruiz-Soto, J.Berciano. Why do motor neurons degenerate? Actualisation in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurología (English Edition)* 2019 feb; 34 (1): 27-37.
- Jekins TM, Alix JJP, David C, Pearson E, Rao DG, Hoggard N et al. Imaging muscle as a potential biomarker of denervation in motor neuron disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2018; 89:248-55.

- Johnson DA, Johnson JA. Nrf2-a therapeutic target for the treatment of neurodegenerative diseases. *Free Radic Biol Med.* 2015; 88: 253-67.

## K

- Kalra S. Magnetic Resonance Spectroscopy in ALS. *Front Neurol.* 2019 May 10; 10: 482.

- Kametani F, Obi T, Shishido T, et al. Mass spectrometric analysis of accumulated TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis brains. *Sci Rep.* 2016;6:23281.

- Kanai K, Yokota T, Shibuya K, Nakazato T, Kanouchi T, Iwai Y et al. Increased motor axonal persistent sodium currents is associated with rapid region spreading in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci.* 2017; 381:558.

- Karch CM, Wen N, Fan CC, Yokoyama JS, Kouri N, Ross OA, et al. Selective Genetic Overlap between Amyotrophic Lateral Sclerosis and Diseases of the Frontotemporal Dementia Spectrum *JAMA Neurol.* 2018 Jul 1;75 (7):860-875.

- Kartja Burk, R Jeroen Pasterkamp. Disrupted neuronal trafficking in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol.* 2019; 137 (6): 859-877.

- Kazutoshi Watanabe, Masahiko Tanaka, Satoshi Yuki, Manabu Hirai, Yorihiro Yamamoto. How is edaravone effective against acute ischemic stroke and amyotrophic lateral sclerosis? *J Clin Biochem Nutr.* 2018 Jan; 62 (1): 20-38.

- Kellogg J, Bottman L, Arra EJ, Selkirk SM, Kozlowski F. Nutrition management methods effective in increasing weight, survival time and functional status in ALS patients: a systematic review. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* 2018. Feb;19(1-2):7-11.

- Klaips CL, Jayaraj GG, Hartl FU. Pathways of cellular proteostasis in aging and disease. *J Cell Biol.* 2018;217(1):51–63.

- Koh.SH.; Roh.H.; Lee.SM.; Kim.HJ.; Kim.M.; Lee.KW.; et al. Phosphatidylinositol 3-kinase activator reduces motor neuronal cell death induced by G93A or A4V mutant SOD1 gene. *Toxicology.* 2005, 213(1-2):45-55.

- Krach F, Batra R, Wheeler E, Vu A, Wang R, Hutt K et al. Transcriptome-pathology correlation identifies interplay between TDP-43 and the expression of its kinase CK1E in sporadic ALS. *Acta Neuropathol.* 2018; 136: 405-423.

- Kristopher G Hooten, David R Beers, Weihua Zhao, Stanley H Appel. Protective and Toxic Neuroinflammation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotherapeutics.* 2015 Apr; 12 (2): 364-375.

## L

- Lachén-Montes.M.; González-Morales.A.; Zelaya.MV.; Pérez-Valderrama.E.; Ausín.K.; Ferrer.I.; Fernández-Irigoyen.J.; Santamaría.E. Olfactory bulb neuroproteomics reveals a chronological perturbation of survival routes and a disruption of prohibitin complex during Alzheimer's disease progression. *Sci Rep.* 2017, 7(1):9115.
- Laferrière F, Maniecka Z, Pérez-Berlanga M, et al. TDP-43 extracted from frontotemporal lobar degeneration subject brains displays distinct aggregate assemblies and neurotoxic effects reflecting disease progression rates. *Nat Neurosci.* 2019;22(1):65–77.
- Lasienne J, Yamanaka K. Glial cells in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Res Int.* 2011.
- Lehnert S, Costa J, De Carvalho M, Kirby J, Kuzma-Kozakiewicz M, Morelli C et al. Multicentre quality control evaluation of different biomarker candidates for amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler frontotemporal Degener.* 2014; 15: 344-50.
- Leigh P, Anderton B, Dodson A, Gallo JM, Swash M, Power D. Ubiquitin deposits in anterior horn cells in motor neurone disease. *Neuroscience letters.* 1988; 93: 197-203.
- Leslie I Grad, Guy A Rouleau, John Ravits, Neril R Cashman. Clinical spectrum of Amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2017. Aug; 7 (8).
- Lian L, Liu M, Cui L, Guan Y, Liu T, Cui B, Zhang K, Tai H, Shen D. Environmental risk factors and amyotrophic lateral sclerosis (ALS): A case-control study of ALS in China. *J Clin Neurosci.* 2019 May 30.
- Lin C-LG, Bristol LA, Jin L et al. Aberrant RNA processing in a neurodegenerative disease: the cause for absent EAAT2, a glutamate transporter, in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron*1998;20:589-602.
- Ling SC, Polymenidou M, Cleveland DW. Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis. *Neuron.* 2013;79(3):416–438.
- Liu D, Liu C, Li J, Azadzi K, Yang Y, Fei Z et al. Proteomic analysis reveals differentially regulated protein acetylation in human amyotrophic lateral sclerosis spinal cord. *PLoS One.* 2013; 8 (12).
- Liu J, Gao L, Zang D. Elevated Levels of IFN- $\gamma$  in CSF and Serum of Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PLoS One.* 2015;10(9):e0136937. Published 2015 Sep 2.
- Liu Z, Li H, Hong C, Chen M, Yue T, Chen C et al. ALS-Associated E478G mutation in Human OPTN (Optineurin) promotes inflammation and induces neuronal cell death. *Front Immunol.*2018 Nov 14;9:2647.
- Logroscino G, Piccininni M. Amyotrophic Lateral Sclerosis descriptive Epidemiology: The origin of geographic difference. *Neuroepidemiology* 2019; 52 (1-2): 93-103.
- Logroscino G; Traynor BJ; Hardiman O; et al. Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Europe. *J NeurolNeurosurgPsychiatry* 2010; 81: 385.

- Lowe J, Lennox G, Jefferson D, et al. A filamentous inclusion body within anterior horn neurones in motor neurone disease defined by immunocytochemical localisation of ubiquitin. *Neuroscience letters*. 1988; 94: 203-210.
- Lu CH, Allen K, Oei F, Leoni E, Kuhle J, Tree T et al. Systemic inflammatory response and neuromuscular involvement in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2016.
- Lu CH, Petzold A, Topping J, Allen K, Macdonald-Wallis-C, Clarke J, et al. Plasma neurofilament heavy chain levels and disease progression in amyotrophic lateral sclerosis: insights from a longitudinal study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2015, 86(5):565-73.
- Lyu XJ, Li HZ, Ma X, et al. Elevated S100A6 (Calcyclin) enhances tumorigenesis and suppresses CXCL14-induced apoptosis in clear cell renal cell carcinoma. *Oncotarget*. 2015;6(9):6656–6669

## M

- Maarten D, Ludo VDB, Robberecht W. Microglia in Amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neurol Belg*. 2007;107:63-70.
- Madelyn E McCaluley, Robert H Baloh. Inflammation in ALS/FTD pathogenesis. *Acta Neuropathol*. 2019; 137 (5):715-730.
- Mandrioli J.; Michalke.B.; Solovyev.N.; Grill.P.; Violi.F.; Lunetta.C.; Conte.A.; Sansone.VA.; Sabatelli.M.; Vinceti.M. Elevated Levels of Selenium Species in Cerebrospinal Fluid of Amyotrophic Lateral Sclerosis Patients with Disease-Associated Gene Mutations. *Neurodegener Dis*. 2017;17(4-5):171-180.
- Mann DMA, Snowden JS. Frontotemporal lobar degeneration: Pathogenesis, pathology and pathways to phenotype. *Brain Pathol*. 2017;27(6):723–736.
- Mariosa D, Hammar N, Malmström H, Hirotani M, Ingre C, Junger I et al. Blood biomarkers of carbohydrate, lipid and apolipoprotein metabolism and risk of amyotrophic lateral sclerosis: a more than 20 year follow-up of the Swedish AMORIS cohort. *Ann Neurol*. 2017; 81: 718-28.
- Marogianni C, Rikos D, Provatas A, Dadouli K, Ntellas P, Tsitsi P et al. The role of C9orf in neurodegenerative disorders: a systematic review, an updated meta-analysis, and the creation of an online database. *Neurobiol Aging*. 2019 Apr 24.
- Martinez-Merino L, Iridoy M, Galbete A, et al. Evaluation of Chitotriosidase and CC-Chemokine Ligand 18 as Biomarkers of Microglia Activation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurodegener Dis*. 2018;18(4):208–215
- Maruyama H, Morino H, Ito H, Izumi Y, Kato H, Watanabe Y, et al. Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*. 2010, 465(7295):223-6.
- McCaluley ME, Baloch RH. Inflammation in ALS/FTD pathogenesis. *Acta Neuropathol*. 2019; 137(5): 715-730.

- McCluskey L, Vandriel S, Elman L, et al. ALS-Plus syndrome: non-pyramidal features in a large ALS cohort. *J Neurol Sci.* 2014;345(1-2):118–124.
- McCombe PA, Pfluger C, Singh P, Lim CY, Airey C, Henderson RD. Serial measurements of phosphorylated neurofilament-heavy in the serum of subjects with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci.* 2015;353(1-2):122–129.
- Menon P, Geevasinga N, van den Bos M, Yiannikas C, Kiernan MC, Vucic S. Cortical hyperexcitability and disease spread in amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurol.* 2017;24(6):816–824.
- Merico A, Cavinato M. Autonomic dysfunction in the early stage of ALS with bulbar involvement. *Amyotrophic lateral sclerosis.* 2011; 12 (5): 363-7.
- Michael Hinchcliffe, Alan Smith. Riluzole: real-world evidence supports significant extension of median survival times in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *DegenerNeurolNeuromuscul Dis.* 2017 May 29.
- Mitsuyama Y. Presenile dementia with motor neuron disease. *Dement Geriatri Cogn Disord.* 1994; 137-142.
- Mizuno Y, Amari M, Takatama M, Aizawa H, Mihara B, Okamoto K. Transferrin localizes in Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol.* 2006;112(5):597–603.

## N

- Nakayama Y, Shimizu T, Matsuda C, Haraguchi M, Hayashi K, Bokuda K et al. Body weight variation predicts disease progression after invasive ventilation in amyotrophic lateral sclerosis. *Sci Rep.* 2019. Aug 22; 9(1):12262.
- Natalia Nowicka, Jakub Juranek, JudytaK.Juranek, Joanna Wojtkiewicz. Risk Factors and Emerging Therapies in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Int J Mol Sci.* 2019 20(11): 2616.
- Neary D, Snwoden JS, Mann DM, Northen B, Goulding PJ, Macdermott N. Frontal lobe dementia and motor neuron disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1990; 53(1): 23-32
- Neumann M, Mackenzie IRA. Review: Neuropathology of non-tau frontotemporal lobar degeneration. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2019 Feb;45(1):19-40.
- Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT et al. Ubiquitinated TDP43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science.* 2006. Oct 6; 314: 130-3.
- Ning X, Sun S, Zhang K, et al. S100A6 protein negatively regulates CacyBP/SIP-mediated inhibition of gastric cancer cell proliferation and tumorigenesis. *PLoS One.* 2012;7(1):e30185

## Ñ

## O

89

**Estudio protALS: Análisis proteómico en tejido postmortem de sujetos con Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA). Búsqueda de biomarcadores y dianas terapéuticas.**

Autora: Marina Oaia Iridoy Zulet

- O'Brien D, Stavroulakis T, Baxter S, Norman P, Bianchi S, Elliott M et al. The optimisation of non-invasive ventilation in amyotrophic lateral sclerosis: A systematic review. *Eur Respir J*. 2019. Jul 4.
- Oggiano R, Solinas G, Forte G, Bocca B, Farace C, Pisano A et al. Trace elements in ALS patients and their relationships with clinical severity. *Chemosphere*. 2018; 197:457-66.
- Okamoto K, Hirai S, Amari M, Watanabe M, Sakurai A. Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis with rabbit anti-cystatin C serum. *Neuroscience letters*. 1993; 162: 125-128.
- Okita T, Nodera H, Shibuta Y, Nodera A, Asanuma K, Shimatani Y, Sato K, Izumi Y, Kaji R. Can Awaji ALS criteria provide earlier diagnosis than the revised El Escorial criteria? *J Neurol Sci*. 2011. Mar 15; 302 (1-2):29-32.
- Ong ML, Tan PF, Holbrook JD. Predicting functional decline and survival in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS ONE*. 2017.
- Oskarsson B, Gendron TF, Staff NP. Amyotrophic Lateral Sclerosis: An Update for 2018. *Mayo Clin Proc*. 2018 Nov; 93 (11): 1617-1628.

## P

- Pagani M, Chio A, Valentini MC, Oberg J, Nobili F, Calvo A et al. Functional pattern on brain FDG-PET in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*. 2014; 83: 1067-74.
- Pagliardini V, Pagliardini S, Corrado L, Lucenti A, Panigati L, Bersano E, et al. Chitotriosidase and lysosomal enzymes as potential biomarkers of disease progression in amyotrophic lateral sclerosis: a survey clinic-based study. *J Neurol Sci*. 2015 Jan 15;348(1-2):245-50.
- Paipa AJ, Povedano M, Barcelo A, Dominguez R, Saez M, Turon J et al. Survival benefit of multidisciplinary care in amyotrophic lateral sclerosis in Spain: association with noninvasive mechanical ventilation. *J Multidiscipl Healthc*. 2019. Jun 19;12:465-470.
- Peters OM, Ghasemi M, Brown RH Jr. Emerging mechanisms of molecular pathology in ALS [published correction appears in *J Clin Invest*. 2015 Jun;125(6):2548]. *J Clin Invest*. 2015;125(5):1767–1779.
- Piao YS, Wakabayashi K, Kakita A et al. Neuropathology with clinical correlations of sporadic amyotrophic lateral sclerosis: 102 autopsy cases examined between 1962 and 2000. *Brain pathology*. 2003; 13:10-12.
- Poujois A, Scheinder FC, Faillenot I, Camdessanche JP, Vandenberghe N, Thomas-Anterion C et al. Brain plasticity in the motor network is correlated with disease progression in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Brain Mapping*. 2013; 34:2391-401.
- Pradas J; Puig T; Rojas R; et al. Amyotrophic Lateral Sclerosis in Catalonia: A population base study. *AmyotrophLatSclerFontotemporalDegener* 2013; May 14(4): 278-83.

## Q

-Quarracino C, Segamarchi MC, Rodriguez GE. Predictors of amyotrophic lateral sclerosis mimic syndrome. *Acta Neurol Belg.* 2019 jun; 119(2): 253-256.

## R

- Ramadan N, Ghazale H, El-Sayyad M, El-Haress M, Kobeissy FH. Neuroproteomics Studies: Challenges and Updates. *Methods Mol Biol.* 2017;1598:3–19.

- Ranganathan.S.; Williams.E.; Ganchev.P.; Gopalakrishnan.V.; Lacomis.D.; Urbinelli.L.; et al. Proteomic profiling of cerebrospinal fluid identifies biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem.* 2005, 95(5):1461-71.

- Raymond J, Oskarsson B, Mahta B, Horton K. Clinical characteristics of a large cohort of US participants enrolled in the National Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) Registry, 2010-2015. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* 2019 May 26:1-8.

- Robert H.Brown, D.Phil, M.D and Ammar Al.Chalabi. Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N Engl J Med* 2017; 377: 162-72.

- Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature.* 1993 mar 4; 362 (6415): 59-62.

- Ross MA, Miller RG, Berchert L et al. Toward earlier diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Revised criteria. *Neurology.* 1998; 50: 768-772.

- Rossi D, Volanti P, Brambilla L, Colletti T, Spataro R, La Bella V. CSF neurofilament proteins as diagnostic and prognostic biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol.* 2018;265(3):510–521.

- Rudrabhatla P.; Albers.W.; Pant.HC. Peptidyl-prolyl isomerase 1 regulates protein phosphatase 2A-mediated topographic phosphorylation of neurofilament proteins. *J Neurosci.* 2009, 29(47):14869-80

- Rudrabhatla P, Pant HC. Phosphorylation-specific peptidyl-prolyl isomerization of neuronal cytoskeletal proteins by Pin1: implications for therapeutics in neurodegeneration. *J Alzheimers Dis.* 2010;19(2):389–403. doi:10.3233/JAD-2010-1243

- Rutkove SB, Caress JB, Cartwright MS, Burns TM, Warder J David WS et al. Electrical impedance myography correlates with standard measures of ALS severity. *Muscle Nerve.* 2014; 49: 441-3.

- Ryberg H, An J, Darko S, Lustgarten JL, Jaffa M, Gopalakrishnan V et al. Discovery and verification of amyotrophic lateral sclerosis biomarkers by proteomics. *Muscle Nerve.* 2010. 42: 104-11.

## S

- Saberi S, Stauffer JE, Schulte DJ, Ravits J. Neuropathology of Amyotrophic Lateral Sclerosis and its variants. *NeurolClín.* 2015 Nov; 33 (4): 855-76.
- Sanchez B, Rutkove SB. Electrical impedance myography and its applications in neuromuscular diseases. *Neurotherapeutics.* 2017; 14:107-18.
- Sarah Martin, Ahmad Al Khleifat, Ammar Al-Chalabi. What causes amyotrophic lateral sclerosis? *Version 1.F1000Res.* 2017;6:371.
- Schifer D, Autilio-Gambetti L, Chio A et al. Ubiquitin in motor neuron disease: study at the light and electron microscope. *J Neuropathol Exp Neurol* 1991;50:463-473.
- Shah.SA.; Lee.HY.; Bressan.RA.; Yun.DJ.; Kim.MO. Novel osmotin attenuates glutamate-induced synaptic dysfunction and neurodegeneration via the JNK/PI3K/Akt pathway in postnatal rat brain. *Cell Death Dis.* 2014, 5:e1026
- Sharma R, Hicks S, Berna CM, Kennard C, Talbot K, Turner MR. Oculomotor Dysfunction in Amyotrophic lateral sclerosis: A comprehensive review. *Arch Neurol.* 2011.Jul 1; 68 (7): 857-61.
- Shephard SR, Wu J, Cardoso M, Wicklendt L, Dinning PG, Chataway T et al. Urinary p75 (ECD): a prognostic, disease progression, and pharmacodynamic biomarker in ALS. *Neurology.* 2017; 74: 1446-54.
- Siew JJ, Chen HM, Chen HY, et al. Galectin-3 is required for the microglia-mediated brain inflammation in a model of Huntington's disease. *Nat Commun.* 2019;10(1):3473.
- Simon NG, Lagopoulos J, Paling S, Pfluger C, Park SB, Howells J et al. Peripheral nerve diffusion tensor imaging as a measure of disease progression in ALS. *J Neurol.* 2017; 264: 882-90.
- Smith.BN.; Ticozzi.N.; Fallini.C.; Gkazi.AS.; Topp.S.; Kenna.KP.; et al. Exome-wide rare variant analysis identifies TUBA4A mutations associated with familial ALS. *Neuron.* 2014 Oct 22;84(2):324-31.
- Sotgiu S, Barone R, Zanda B, et al. Chitotriosidase in patients with acute ischemic stroke. *Eur Neurol.* 2005;54(3):149–153. doi:10.1159/000089935
- Steinacker P, Verde F, Fang L, Feneberg E, Oeckl P, Roeber S et al. Chitotriosidase (CHIT1) is increased in microglia and macrophages in spinal cord of amyotrophic lateral sclerosis and cerebrospinal fluid levels correlate with disease severity and progression. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2018; 89:239-47.
- Strong MJ, Abrahams S, Goldstein LH, Wooley S, Mclaughlin P, Snowden J et al. Amyotrophic lateral sclerosis- Frontotemporal spectrum disorder (ALS-FTSD): Revised diagnosis criteria. *Amyotroph lateral scler frontotemporal degener.* 2017; 18: 153-174.
- Svitlana Garbouza-Davis, Avey Thomson, Crupa Kurien, R Douglas Shytle, Paul R Sanberg. Potential new complication in drug therapy development for amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Rev Neurother.* 2016 Dec; 16(12): 1397-1405.



## T

- Tadic V, Prell T, Lautenschlaeger J, Grosskreutz J. The ER mitochondria calcium cycle and ER stress response as therapeutic targets in amyotrophic lateral sclerosis. *Front Cell Neurosci.* 2014;8:147. Published 2014 May 30.
- Taga A, Maragkis NJ. Current and emerging ALS biomarkers: utility and potential in clinical trials. *Expert Rev Neurother.* 2018 Nov; 18(11): 871-886.
- Tai H, Cui L, Guan Y, Liu M, Li X, Shen D et al. Correlation of creatine kinase levels with clinical features and survival in amyotrophic lateral sclerosis. *Front Neurol.* 2017; 8:322.
- Thomas JH, Rebecca SG, Flora Cheng, Stephanie LR, Jennilee MD, Alana DL et al. Proteomics approaches for biomarker and drug target discovery in ALS and FTD. *Front Neurosci.* 2019;13:548.
- Tönges L.; Günther.R.; Suhr.M.; Jansen.J.; Balck.A.; Saal.;KA,et al. Rho kinase inhibition modulates microglia activation and improves survival in a model of amyotrophic lateral sclerosis. *Glia.* 2014, 62(2):217-32.
- Topolska-Woś AM, Chazin WJ, Filipek A. CacyBP/SIP--Structure and variety of functions. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1860(1 Pt A):79–85.
- Traynor BJ, Cood MB, Corr B, Forde C, Frost E, Hardiman O. Amyotrophic lateral sclerosis mimic syndromes. A population-based study. *Arch Neurol* 2000; 57: 109-113.
- Tsukie T, Masaki H, Yoshida S, Fujikura M, Ono S. Decreased amount of Collagen in the skin of Amyotrophic Lateral Sclerosis in the Kii peninsula of Japan. *Acta Neurol Taiwan.* 2014 sep; 23 (3): 82-9.

## U

- Udaya GV, Vanessa M, Mei Yu CS, Anthony JB, William D, Stephanie MRD. A systematic Review of suggested molecular strata, biomarkers and their tissue sources in ALS. *Front Neurol.* 2019, 10: 400.
- Umoh ME, Dammer EB, Dai J, Duong DM, Lah JJ, Levey AL et al. A proteomic Network approach across the ALS-FTD disease spectrum resolves clinical phenotypes and genetic vulnerability in human brain. *EMBO Mol Med.* 2018; 10 (1): 48-62.

## V

- Van Dijk JP, Schelhaas HJ, Van Schaik IN, Janssen HM, Stegeman DF, Zwartz MJ. Monitoring disease progression using high-density motor unit number estimation in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve.* 2010;42(2):239–244.

- Vance C, Rogelj B, Hortobagyi T et al. Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science*. 2009; 323: 1208-1211.
- Varghese AM, Sharma A, Mishra P, et al. Chitotriosidase - a putative biomarker for sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Proteomics*. 2013;10(1):19. Published 2013 Dec 2
- Vehviläinen.P.; Koistinaho.J.; Gundars.G. Mechanisms of mutant SOD1 induced mitochondrial toxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *Front Cell Neurosci*. 2014, 8:126.

## W

- Wagey RT.; Krieger.C. Abnormalities of protein kinases in neurodegenerative diseases. *Prog Drug Res*. 1998;51:133-83.
- Wais V, Rosenbohm A, Petri S, Kollewe K, Hermann A, Storch A et al. The concept and diagnostic criteria of primary lateral sclerosis. *Acta Neurol Scand*. 2017 sept; 136 (3): 204-211.
- Wang X.; Zhang.S.; Lin.F.; Chu.W.; Yue.S. Elevated Galectin-3 Levels in the Serum of Patients With Alzheimer's Disease. *Am J Alzheimers Dis Other Demen*.2015, 30(8):729-32.
- Waring SC, Esteban-Santillan C, Reed DM, Craig UK, Labarthe DR, Petersen RC, Kurland LT. Incidence of amyotrophic lateral sclerosis and of the parkinsonism-dementia complex of Guam 1950-1989. *Neuroepidemiology* 2004 Jul-Aug; 23 (4): 192-200.
- Wasik U, Schneider G, Mietelska-Porowska A, et al. Calcyclin binding protein and Siah-1 interacting protein in Alzheimer's disease pathology: neuronal localization and possible function. *Neurobiol Aging*. 2013;34(5):1380–1388.
- Wiedermann FR, Winkler K, Kuznetsov A et al. Impairment of mitochondrial function in skeletal muscle of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci*. 1998; 156: 65-72.
- Wijesekera LC, Mathers S, Talman P, Galtrey C, Parkinson MH, Ganesalingam J et al. Natural History and clinical features of the flail arm and flail leg ALS variants. *Neurology*. 2009. Mar 24; 72 (12): 1087-94.
- William RS, Colin PSK, Edward OL, Darlene EB, John JK. ALS blood expression profiling identifies new biomarkers, patient subgroups, and evidence for neutrophilia and hypoxia. *J Transl Med*. 2019; 17: 170.
- Wilson.ME.; Boumaza.I.; Lacomis.D.; Bowser.R. Cystatin C: a candidate biomarker for amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One*.2010, 5(12):e15133.
- Woehlbier.U.; Colombo.A.; Saaranen.MJ.; Pérez.V.; Ojeda.J.; Bustos.FJ.; et al. ALS-linked protein disulfide isomerase variants cause motor dysfunction. *EMBO J*. 2016, 35(8):845-65
- Wolf J, Safer A, Wöhrle JC, Palm F, Nix WA, Maschke M et al. Variability and prognostic relevance of different phenotypes in amyotrophic lateral sclerosis- data from a population-based registry. *J Neurol Sci*. 2014 Oct 15; 345 (1-2): 164-7.

- Wong.NK.; He.BP.; Strong. MJ. Characterization of neuronal intermediate filament protein expression in cervicalspinalmotorneurons in sporadicamyotrophiclateralsclerosis (ALS). *J Neuropathol Exp Neurol.* 2000, 59(11):972-82.

## X

-Xia Q, Li X, Zhou H, Zheng L, Shi J. S100A11 protects against neuronal cell apoptosis induced by cerebral ischemia via inhibiting the nuclear translocation of annexin A1. *Cell Death Dis.* 2018;9(6):657. Published 2018 May 29.

## Y

- Yan.J.; Xu.Y.; Zhang.L.; Zhao.H.; Jin.L.; Liu.WG.; et al. Increased Expressions of Plasma Galectin-3 in Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Chin Med J (Engl).* 2016 Dec 5;129(23):2797-2803.

- Yin X.; Ren.M.; Jiang.H.; Cui.S.; Wang.S.; Jiang. H. Downregulated AEG-1 together with inhibited PI3K/Akt pathway is associated with reduced viability of motor neurons in an ALS model. *Mol Cell Neurosci.* 2015, 68:303-13.

- Yunusova Y, Plowman EK, Green JR, Barnett C, Bede P. Clinical measures of Bulbar Dysfunction in ALS. *Front Neurol.* 2019 Feb 19; 10:106.

## Z

- Zhou JI; Afjehi-Sadat L; Asress S; Duong DM; Cudkowicz M; Glass JD; Peng J. Galectin-3 is a candidate biomarker for amyotrophic lateral sclerosis: discovery by a proteomics approach. *J Proteome Res.* 2010, 1;9(10):5133-4.

- Zhou JY, Afjehi-Sadat L, Asress S, et al. Galectin-3 is a candidate biomarker for amyotrophic lateral sclerosis: discovery by a proteomics approach. *J Proteome Res.* 2010;9(10):5133–5141.

- Zou ZY, Zhou ZR, Che CH, Liu CY, He RL, Huang HP. Genetic epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *J NeurolNeurosurg Psychiatry,* 2017 Jul 88 (7): 540-549.

Zubiri I, Lombardi V, Bremang M, et al. Tissue-enhanced plasma proteomic analysis for disease stratification in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Neurodegener.* 2018;13(1):60. Published 2018 Nov 7



