

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**La infusión intracerebral de líquido cefalorraquídeo de
pacientes de esclerosis lateral amiotrófica en rata como
modelo de difusión de la enfermedad**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Lidia Moreno Jiménez

Directores

Jorge Matías-Guiu Guía
Ulises Gómez Pinedo

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**LA INFUSIÓN INTRACEREBRAL DE LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO DE
PACIENTES DE ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA EN RATA COMO
MODELO DE DIFUSIÓN DE LA ENFERMEDAD**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

LIDIA MORENO JIMÉNEZ

DIRECTORES

Prof. JORGE MATÍAS-GUIU GUÍA

Dr. ULISES GÓMEZ PINEDO

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han colaborado en la realización de este trabajo:

Al Prof. Jorge Matías-Guiu, por darme la oportunidad de incorporarme a su grupo de investigación, así como de realizar esta tesis bajo su dirección y poder contar siempre con su inestimable consejo y experiencia.

Al Dr. Ulises Gómez Pinedo, por darme la oportunidad de realizar esta tesis, por acompañarme en cada proceso, pero dejándome la libertad de tomar decisiones. Por tus inestimables consejos a lo largo de estos años, así como por todas tus enseñanzas que han sido infinitas. Gracias por tu extraordinaria ayuda durante todos estos años, pero especialmente gracias por estos últimos meses. Gracias por darme fuerzas cuando estas flaqueaban, por confiar en mí, más de lo que yo misma hago. En definitiva, gracias por ser el mejor jefe que alguien pudiera tener.

A la Dra. María Cruz García Martín, por aceptar ser mi tutora y estar siempre pendiente ante cualquier cuestión donde se la requiera, gracias por hacer todo el proceso mucho más sencillo.

Al Dr. Juan de los Reyes Aguilar, por enseñarme todo lo que sé sobre electrofisiología, y por su inestimable ayuda durante todos estos años, así por como por todos sus consejos durante el proceso de redacción de este proyecto.

A Marisol, porque tener una compañera y amiga como tú no tiene precio. Porque encontrar a alguien con la complicidad de que, con sólo mirarse, adivinar lo que la otra piensa, hace que el trabajo sea maravilloso. Mil gracias por todas tus enseñanzas desde el día uno que entré por la puerta del laboratorio y mil gracias por tu inestimable ayuda en todo el proceso; esta tesis sin ti no hubiera sido la misma. Sé que me llevo una amiga para siempre.

A todos los que han pasado por el Laboratorio de Neurobiología del Hospital Clínico San Carlos que han conseguido con su ayuda y buena disposición este estudio salga hacia delante, en especial a Noelia, Vanesa, Denise y Carolina.

A todos los integrantes del Departamento de Medicina y Cirugía Experimental. A Pablo por sus sabias palabras todos estos años, a Arkaitz y Marcos por ayudarme con todos los trámites que requiere esta tesis siempre con una sonrisa, al Laboratorio 5, Aarón, María Villa, María Martínez y Laura por compartir vuestro laboratorio con nosotras cuando os necesitábamos y al Laboratorio 3, Silvia, Juanmi, Luis e Irene gracias por estar ahí día a día.

A Maricruz, Loli y Patricia, por hacer que ir a trabajar cada día sea un placer, y tener siempre una sonrisa o una palabra bonita cuando es necesario. Gracias por conseguir que cada rato juntas haya sido un momento irrepetible. Gracias también por estar ahí ante cualquier duda, pregunta o petición y resolverlo todo siempre con una sonrisa.

A todas esas amistades que te da la Universidad, a Marta, Verónica, Alberto, Miguel y muy especialmente a Ana y Virginia. Gracias porque, aunque pasen los años o estemos tiempo sin hablar, es como si no hubiera pasado el tiempo cuando nos vemos. Gracias Virginia por ser la mejor amiga que he podido tener, gracias por tus consejos y por estar siempre ahí.

A mis padres, por ser el mejor ejemplo a seguir que se puede tener. Gracias por todo lo que me habéis enseñado a lo largo de mi vida, gracias por enseñarme que siempre hay que luchar por los sueños y que con esfuerzo todo se consigue. Gracias por apostar siempre por mí, animarme y apoyarme en todas las decisiones que he tomado. Gracias por conseguir serenarme en los momentos de tensión y por poner un poco de cordura a todo este proceso. Gracias también por cuidarme y ayudarme todos estos años, aunque sea desde la distancia.

A David, gracias por iluminar siempre el camino, por estar ahí, por tener siempre una palabra bonita con la que los momentos de desazón y cuando la falta de autoconfianza empezaba a aparecer, se esfumaran, por aguantar mis malos momentos y conseguir que se transformaran en inolvidables, sólo con tu presencia. Gracias por apoyarme y animarme en todos los proyectos en los que me embarco y gracias de verdad por cada segundo.

LISTADO DE ABREVIATURAS

AAV	Virus adenoasociados
Abs	Absorbancia
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALS	Del inglés <i>alsin</i>
ALSFRS	Escala revisada de Valoración Funcional de la Esclerosis Lateral Amiotrófica
AMP	Atrofia muscular progresiva
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
ANOVA	Análisis de la varianza
APP	Proteína Precursora de Amiloide
Arg1	Arginasa 1
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATP	Adenosín trifosfato
Aβ	β -Amiloide
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BHE	Barrera hematoencefálica
C9ORF72	Del inglés <i>chromosome 9 open reading frame 72</i>
CA1	Cuerno de Ammón 1
CD86	Del inglés <i>Cluster of Differentiation 86</i>
ChAT	Acetilcolintransferasa
CPU	Unidad central de procesamiento
Cy	Cianina
DAPI	Diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol
DFT	Demencia frontotemporal

DMSO	Dimetilsulfóxido
DPBS	Del inglés <i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
DPR	Dipéptidos de repetición
EAAT2	Del inglés <i>Excitatory Amino Acid Transporter-2</i>
EBSS	Del inglés Earle's Balanced Salt Solution
ELA	Esclerosis Lateral Amiotrófica
ELAbi	ELA con deterioro conductual
ELAcI	ELA con deterioro cognitivo
ELA-E	ELA esporádica
ELA-F	ELA familiar
ELP	Esclerosis Lateral Primaria
EMG	Electromiograma
EMT	Estimulación Magnética Transcraneal
ErBB4	Proteína tirosina quinasa receptora erbB-4
FDA	Del inglés <i>U.S. Food and Drug Administration</i>
FUS	Del inglés <i>Fused in Sarcome</i>
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GFAP	Proteína acídica fibrilar glial
GLT1	Del inglés <i>Astrocytic Glutamate Transporter 1</i>
GPR17	Receptor de nucleótido de uracilo/cisteinil leucotrieno
GPX4	Glutación peroxidasa 4
HII	Hipertensión intracraneal idiopática
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia

HRE	Expansiones de la repetición del hexanucleótido
HSP	Proteínas de shock térmico
IBA1	Molécula adaptadora 1 de unión a calcio ionizado
ICV	Infusión intracerebroventricular
IGF1	Factor de Crecimiento Similar a la Insulina 1
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintasa
IT	Distancia entre el primer y el quinto dedo
JELA	Esclerosis Lateral Amiotrófica Juvenil
KO	<i>Knock-out</i>
L-BMAA	Beta-N-metilamino-L-alanina
LCR	Líquido Cefalorraquídeo
MHCII	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase II
mIns	Myo-inositol
MMRR	Medidas repetidas
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NAA	N-acetilaspártato
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
NES	Región señalizadora de exportación nuclear
NF	Neurofilamentos
NFL	Del inglés <i>Neurofilament Light Chain</i>
NG2	Del inglés Neuron-glial antigen 2
NMDA	Ácido N-metil-D-aspártico
NSL	Señal de localización nuclear

OCT	Del inglés <i>Optimal Cutting Temperature</i>
OLs	Oligodendrocitos
OPCs	Células progenitoras de oligodendrocitos
Oxr1	Proteína de resistencia a la oxidación 1
p62	Nucleoporina 62
PARP-1	Poli (ADP-Ribosa) polimerasa 1
PBP	Parálisis Bulbar Progresiva
PBS	Del inglés <i>phosphate buffered saline</i>
PET	Del inglés <i>Positron Emission Tomography</i>
PFN1	Del inglés <i>Profilin 1</i>
PL	Largo de la huella
poli-GA	Dipéptido poli Glicina-Alanina
poli-GP	Dipéptido poli Glicina-Prolina
poli-GR	Dipéptido poli Glicina-Arginina
poli-PA	Dipéptido poli Prolina-Alanina
poli-PR	Dipéptido poli Prolina-Arginina
PTA	PBS + Tritón + albúmina bovina
p-TAU	Fosfo-TAU
QGSY	Dominio N-terminal de activación transcripcional
RGG	Región de repetición de arginina-glicina-glicina
ROS	Del Ingles <i>Reactive oxygen species</i>
S100β	Del inglés S100 calcium-binding protein B
SEM	Error estándar de la media
SEXT	Del inglés <i>senataxin</i>

SFI	Del inglés Sciatic Functional Index
SNC	Sistema Nervioso Central
SOD1	Superóxido Dismutasa 1
TARDBP	Del inglés <i>TAR DNA Binding Protein</i>
TDP43	Del inglés <i>transactive response DNA-binding protein 43</i>
TGF-β1	Factor de crecimiento transformante beta 1
TLDc	Dominio catalítico
TLR	Receptores <i>Toll-like</i>
TLS	Del inglés Translocated in liposarcoma
TNFα	Factor de Necrosis Tumoral alfa
TOF	Distancia al pie opuesto
TS	Distancia entre el primer y el quinto dedo
VEGF	Factor de Crecimiento Vascular Endotelial
Vps54	Del inglés Vacuolar Protein Sorting-Associated Protein 54
Wt	Del inglés <i>wild-type</i>
ZnF	Motivo de dedo de zinc (ZnF)

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Características Clínicas de la ELA.....	4
Figura 2: Espectro Esclerosis Lateral Amiotrófica-Demencia Frontotemporal.	6
Figura 3: Espectro de polarización de la microglía activada.	13
Figura 4: Tipos de astrocitos.	16
Figura 5: Funciones fisiológicas de los astrocitos.....	17
Figura 6: Representación esquemática de las interacciones entre las motoneuronas y los astrocitos.....	19
Figura 7: Genes asociados a la ELA y año de descubrimiento. Se señalan en rojo los principales genes causantes de la ELA.....	30
Figura 8: Mecanismos afectados en ELA-F-C9ORF72.....	41
Figura 9: Ilustración de la vía corticoespinal.	55
Figura 10: Imágenes de la disección de la corteza motora en embriones de rata Wistar E19-21.	86
Figura 11: Esquema de las capas de la bomba osmótica.	92
Figura 12: Esquema de las partes del ALZET Brain Infusion Kit®.	92
Figura 13: Representación del cráneo de una rata.	95
Figura 14: Esquema de la implantación de la bomba osmótica en el ventrículo lateral derecho de la rata.	96
Figura 15: A: Localización de los electrodos de estimulación y registro. B: Músculos internos de la extremidad posterior de rata (vista medial).	97
Figura 16: Estimulador Grass modelo S88.	98
Figura 17: Unidad de Aislamiento PSIU6.....	98
Figura 18: Amplificador AC/DC modelo 3000..	99
Figura 19: Tarjeta analógico/digital..	99
Figura 20: Representación gráfica del Footprint Test.	103
Figura 21: Representación gráfica de las variables a analizar en el Footprint Test.	105
Figura 22: Esquema del procedimiento de extracción y procesado de tejidos.	108
Figura 23: Localización de las imágenes tomadas.....	116
Figura 24: Resultados histológicos de IBA-1 en la Corteza Motora del Modelo Agudo.	121

Figura 25: Resultados del análisis de IBA-1 en la Corteza Motora del Modelo Agudo.....	121
Figura 26: Resultados histológicos de IBA-1 en la Médula Espinal del Modelo Agudo..	122
Figura 27: Resultados del análisis de IBA-1 en la Médula Espinal del Modelo Agudo.....	123
Figura 28: Resultados histológicos de GFAP en la Corteza Motora del Modelo Agudo.	124
Figura 29: Resultados histológicos de GFAP en la Médula Espinal del Modelo Agudo.	125
Figura 30: Resultados GFAP del Modelo Agudo.....	126
Figura 31: Resultados del análisis del marcaje de NeuN tanto en la Corteza Motora como en la Médula Espinal del Modelo Agudo.	127
Figura 32: Resultados histológicos de ChAT en la Corteza Motora del Modelo Agudo.....	128
Figura 33: Resultados del análisis del marcaje de ChAT tanto en la Corteza Motora como en la Médula Espinal del Modelo Agudo..	128
Figura 34: Resultados histológicos de ChAT y Ubiquitina en la Médula Espinal del Modelo Agudo.	130
Figura 35: Resultados del número de inclusiones intracitoplasmáticas tanto en la Corteza Motora como en la Médula Espinal del Modelo Agudo.....	130
Figura 36: Resultados histológicos de IBA-1 en la Corteza Motora del Modelo Crónico.	131
Figura 37: Resultados del estudio del estado de activación de la microglía en la Corteza Motora del Modelo Crónico a través del análisis de Sholl.....	132
Figura 38: Resultados del estudio del estado de activación de la microglía en la Médula Espinal del Modelo Crónico a través del análisis de Sholl.....	133
Figura 39: Resultados de la polarización (M1 y M2) de la microglía en la Corteza Motora del Modelo Crónico.....	135
Figura 40: Resultados de la polarización (M1 y M2) de la microglía en la Médula Espinal del Modelo Crónico.....	136
Figura 41: Resultados del análisis de la intensidad de marcaje de CD86 tanto en Corteza Motora como en Médula Espinal del Modelo Crónico.	136
Figura 42: Resultados del análisis de la intensidad de marcaje de ARG-1 tanto en Corteza Motora como en Médula Espinal del Modelo Crónico..	137
Figura 43: Resultados histológicos de MHCII, CD11b y GFAP en la Corteza Motora del Modelo Crónico.	138
Figura 44: Resultados del análisis de la intensidad de marcaje de MHCII tanto en Corteza Motora como en Médula Espinal del Modelo Crónico..	139

Figura 45: Resultados histológicos de GFAP en la Corteza Motora del Modelo Crónico.....	140
Figura 46: Resultados histológicos de GFAP en la Médula Espinal del Modelo Crónico.	140
Figura 47: Resultados del análisis del marcaje de GFAP del Modelo Crónico.	141
Figura 48: Resultados histológicos de ChAT y Caspasa 3 en la Corteza Motora del Modelo Crónico.	142
Figura 49: Resultados histológicos de ChAT y Caspasa 3 en la Médula Espinal del Modelo Crónico.	143
Figura 50: Resultados del análisis del marcaje de ChAT tanto en la Corteza Motora como en la Médula Espinal del Modelo Crónico..	143
Figura 51: Resultados del análisis del marcaje de Neurofilamentos tanto en la Corteza Motora como en la Médula Espinal del Modelo Crónico.....	144
Figura 52: Inclusiones intracitoplasmáticas en la Corteza Motora..	145
Figura 53: Inclusiones intracitoplasmáticas en la Médula Espinal.....	146
Figura 54: Resultados del número de inclusiones intracitoplasmáticas, tanto en la Corteza Motora como en la Médula Espinal del Modelo Crónico.	146
Figura 55: Resultados electrofisiológicos de la Onda M en el protocolo de intensidades del Modelo Agudo.....	150
Figura 56: Resultados electrofisiológicos de la Onda H en el protocolo de intensidades del Modelo Agudo.....	153
Figura 57: Resultados electrofisiológicos de la Onda M en el protocolo de frecuencias del Modelo Agudo..	155
Figura 58: Resultados electrofisiológicos de la Onda H en el protocolo de frecuencias del Modelo Agudo..	157
Figura 59: Resultados electrofisiológicos de la Onda M en el protocolo de intensidades del Modelo Crónico.....	160
Figura 60: Resultados electrofisiológicos de la Onda H en el protocolo de intensidades del Modelo Crónico.....	163
Figura 61: Resultados electrofisiológicos de la Onda M en el protocolo de frecuencias del Modelo Crónico.	166
Figura 62: Resultados electrofisiológicos de la Onda H en el protocolo de frecuencias del Modelo Crónico..	169
Figura 63: Evolución medio del peso de los animales de ambos modelos.	171

Figura 64: Resultados medios del test de Plano Inclinado dividido por extremidad.....	173
Figura 65: Resultados del Test de Matsumoto.....	175
Figura 66: Resultados del análisis de las huellas.....	176

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Características típicas y relacionadas entre enfermedades neurodegenerativas.....	5
Tabla 2: Criterios de diagnóstico de la ELA.	48
Tabla 3: Variables susceptibles de analizar con el reflejo H.....	51
Tabla 4: Características clínicas de los LCR-ELA del Modelo Agudo.....	83
Tabla 5: Características clínicas de los LCR-ELA del Modelo Crónico.....	84
Tabla 6: Características clínicas de los LCR-Control del Modelo Agudo.	85
Tabla 7: : Características clínicas de los LCR-Control del Modelo Crónico.....	85
Tabla 8: Clasificación de las muestras utilizadas en el Modelo Agudo divididas por tipo de LCR.	94
Tabla 9: Clasificación de las muestras utilizadas en el Modelo Crónico divididas por tipo de LCR.	94
Tabla 10: Anticuerpos primarios utilizados en el Modelo Agudo.	111
Tabla 11: Anticuerpos primarios utilizados en el Modelo Crónico.	113
Tabla 12: Anticuerpos secundarios utilizados en el Modelo Agudo..	114
Tabla 13: : Anticuerpos secundarios utilizados en el Modelo Crónico..	115
Tabla 14: Resultados del análisis del marcaje de IBA-1 tanto de la Corteza Motora como de la Médula Espinal del Modelo Agudo.	123
Tabla 15: Resultados del análisis del marcaje de GFAP tanto de la Corteza Motora como de la Médula Espinal del Modelo Agudo.	126
Tabla 16: Resultados del análisis del marcaje de NeuN tanto de la Corteza Motora como de la Médula Espinal del Modelo Agudo..	127
Tabla 17: Resultados del análisis del marcaje de ChAT tanto de la Corteza Motora como de la Médula Espinal del Modelo Agudo.	129
Tabla 18: Muestras citotóxicas utilizadas en el Modelo Agudo.....	258
Tabla 19: Citotoxicidad de los LCR-ELA del Modelo Crónico.....	259

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1: Mecanismos afectados en ELA-F-C9ORF72.....	41
Esquema 2: Diagrama de flujo a seguir en la escala Matsumoto.	102
Esquema 3: Algoritmo a seguir para el protocolo de Plano Inclinado.....	103

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	1
NEUROLOGÍA DE LA ELA	7
<i>Degeneración de las motoneuronas</i>	<i>7</i>
<i>Inclusiones</i>	<i>8</i>
<i>Neuroinflamación</i>	<i>11</i>
Microglía	12
Astrocitos	14
Oligodendrocitos	19
MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS	21
Estrés oxidativo y Disfunción mitocondrial	21
Desregulación del tráfico axonal	23
Excitotoxicidad mediada por glutamato	25
Alteraciones en el metabolismo y procesamiento del ARN	26
Alteración de la homeostasis proteica	28
CLASIFICACIÓN DE LOS TIPOS DE ELA	29
<i>ELA familiar</i>	<i>29</i>
SOD1	31
TDP43	33
FUS	36
C9ORF72	39
<i>ELA esporádica</i>	<i>43</i>
<i>Otros Tipos de ELA</i>	<i>46</i>
DIAGNÓSTICO DE LA ELA	48
<i>El reflejo H como marcador de la patología</i>	<i>49</i>
VÍA PIRAMIDAL Y ELA	54
MODELOS ANIMALES	56
<i>Modelo Wobbler</i>	<i>56</i>
<i>Modelo SOD1</i>	<i>59</i>
<i>Modelo TDP43</i>	<i>62</i>
<i>Modelo FUS</i>	<i>64</i>
<i>Modelo C9ORF72</i>	<i>66</i>
<i>Modelo químico</i>	<i>67</i>
LCR Y ELA	70
<i>Infusión LCR</i>	<i>71</i>
JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	73
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	75
HIPÓTESIS	76
OBJETIVOS	77
<i>Objetivos Generales</i>	<i>77</i>
<i>Objetivos Particulares</i>	<i>77</i>
MATERIALES Y MÉTODOS	79
DISEÑO EXPERIMENTAL	80
DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES	80
CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN DE LOS ANIMALES EXPERIMENTALES	80
LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO	81
<i>Aspectos éticos</i>	<i>81</i>
<i>LCR-ELA</i>	<i>81</i>
Características y obtención de muestras	81
<i>LCR-Control</i>	<i>84</i>
Características y obtención de muestras	84
<i>Caracterización de las muestras de Líquido Cefalorraquídeo</i>	<i>85</i>

<i>Extracción y cultivo primario de motoneuronas embrionarias</i>	85
Inducción a la citotoxicidad del cultivo de motoneuronas embrionarias	87
Método de cuantificación de citotoxicidad: MTT	88
Método de cuantificación de la viabilidad celular: LIVE&DEAD.....	89
ANIMALES	90
BOMBAS OSMÓTICAS	91
CIRUGÍA	95
ELECTROMIOGRAFÍA	97
<i>EMG Modelo Agudo</i>	99
<i>EMG Modelo Crónico</i>	100
PRUEBAS CONDUCTUALES.....	101
<i>Matsumoto</i>	101
<i>Plano Inclinado</i>	102
<i>Footprint Test</i>	103
PERFUSIÓN INTRACARDIACA	105
EXTRACCIÓN Y PROCESADO DE TEJIDOS	106
INMUNOHISTOQUÍMICA.....	108
ADQUISICIÓN Y ANÁLISIS DE IMÁGENES.....	116
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	117
RESULTADOS.....	119
ANIMALES	120
RESULTADOS DE HISTOLOGÍA.....	120
<i>Modelo Agudo</i>	120
Microglía en corteza motora y médula espinal	120
Astrocitos en corteza motora y médula espinal	124
Neuronas en corteza motora y médula espinal.....	126
Acetilcolintransferasa en corteza motora y médula espinal.....	127
Inclusiones intracitoplasmáticas en corteza motora y médula espinal	129
<i>Modelo Crónico</i>	131
Microglía en corteza motora y médula espinal	131
Complejo Mayor de Histocompatibilidad II en corteza motora y médula espinal.....	137
Astroglía en corteza motora y médula espinal	139
Acetilcolintransferasa en corteza motora y médula espinal.....	141
Neurofilamentos en corteza motora y médula espinal	144
Inclusiones intracitoplasmáticas en corteza motora y médula espinal	145
RESULTADOS ELECTROFISIOLÓGICOS.....	147
<i>Modelo Agudo</i>	147
Intensidades onda M Modelo Agudo	147
Intensidades Onda H Modelo Agudo	151
Frecuencias Onda M Modelo Agudo	154
Frecuencias Onda H Modelo Agudo	156
<i>Modelo Crónico</i>	158
Intensidades Onda M Modelo Crónico	158
Intensidades Onda H Modelo Crónico	161
Frecuencias Onda M Modelo Crónico	164
Frecuencias Onda H Modelo Crónico	167
VARIABLES CLÍNICAS	170
<i>Peso corporal</i>	170
<i>Plano Inclinado</i>	172
<i>Matsumoto</i>	174
<i>Sciatic Functional Index (Footprint test)</i>	175
DISCUSIÓN.....	177
INFUSIÓN DE LCR COMO MODELO ESPORÁDICO DE ELA	178

NEUROINFLAMACIÓN.....	181
<i>Microglía</i>	181
<i>Astrocitos</i>	185
NEURODEGENERACIÓN.....	189
ELECTROFISIOLOGÍA.....	192
COMPORTAMIENTO.....	199
COMPARATIVA DE LA INFUSIÓN DE LCR-ELA AGUDA Y CRÓNICA.....	201
LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....	202
PERSPECTIVAS FUTURAS	204
CONCLUSIONES.....	205
RESUMEN	207
ABSTRACT	213
REFERENCIAS	219
ANEXOS	255
ANEXO 1	256
<i>Modelo de Consentimiento Informado para extracción de LCR</i>	256
ANEXO 2	258
<i>Citotoxicidad LCR</i>	258
Modelo Agudo	258
Modelo Crónico	259
ANEXO 3	260
<i>Aprobación PROEX 005/17</i>	260
ANEXO 4	266
<i>Macros</i>	266
Para separar canales.....	266
Para analizar la intensidad de marcaje	267
ANEXO 5	268
<i>Artículos publicados relacionados con el proyecto de tesis</i>	268
<i>Artículos publicados durante el proyecto de tesis</i>	269
<i>Artículos publicados por parte del grupo de investigación en relación al proyecto de tesis</i>	270

INTRODUCCIÓN

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA), denominada también enfermedad de motoneurona, o enfermedad de Lou Gehrig, fue descrita por primera vez por Jean-Martin Charcot en 1869 aunque el nombre de esclerosis lateral amiotrófica no le fue dado hasta 1874 (1, 2). La nomenclatura de esclerosis lateral refleja la degeneración de las motoneuronas corticoespinales cuyos axones en la médula espinal lateral parecen cicatrizados, mientras que amiotrófica se refiere a la muerte de las motoneuronas espinales con una denervación secundaria y debilidad muscular (3, 4).

La ELA es un desorden neurodegenerativo, progresivo e incapacitante, el cual, tal y como indica su nombre, se caracteriza por la degeneración de las motoneuronas superiores de la corteza cerebral, las motoneuronas inferiores del tronco cerebral y motoneuronas de la médula espinal (4, 5).

La edad de inicio de esta enfermedad es variable, generalmente, suele originarse en la edad adulta, en torno a los 40-60 años (4, 5). Existen casos juveniles (JELA) en los cuales el inicio de la enfermedad sucede en torno a los 25 años, sin embargo, este tipo de ELA es bastante raro (4-6).

La prevalencia global de esta enfermedad es de 4,42 casos por cada 100.000 habitantes, sin embargo, cuando estudiamos la prevalencia según la región, observamos que varía de forma significativa, por ejemplo, en el sudeste asiático la prevalencia es de 1,57 casos por cada 100.000 habitantes, por el contrario, en el este de Europa esta prevalencia asciende hasta los 9,92 casos por cada 100.000 habitantes. Por otro lado, la incidencia global de esta enfermedad es de 1,59, no obstante, varía según la región estudiada desde 0,42 en el sudeste asiático hasta los 2,76 en el este de Europa. Es interesante destacar que tanto la prevalencia como la incidencia es mayor en las regiones más desarrolladas del planeta. Al mismo tiempo, la ratio entre sexos también varía siendo la ratio hombre:mujer de 1,05 exceptuando África donde esta ratio asciende a 2,9 (7-9). La ratio se ve disminuida con la edad debido a que aumenta el riesgo de padecer esta enfermedad en las mujeres, al entrar en la menopausia (10).

Esta enfermedad es un desorden neurodegenerativo donde la esperanza media de vida de los enfermos es corta, entre 3 y 5 años tras el inicio de los síntomas (4, 5). Pero, existe una gran variabilidad en la duración de la enfermedad ya que, dependiendo del tipo de fenotipo de la enfermedad que se presente, hay pacientes que mueren en meses (principalmente aquellos con un inicio más tardío) y pacientes cuya supervivencia aumenta hasta casi más de dos décadas (5), un ejemplo de ello es el caso de Stephen Hawking.

Clínicamente, esta enfermedad comienza con una debilidad muscular progresiva, acompañada de atrofia muscular, así como de fasciculaciones y calambres, culminando en fallo respiratorio, siendo este la principal causa de muerte de los pacientes (11). De forma primaria, la debilidad muscular es focal y posteriormente se transmite a las regiones adyacentes. Además, suele comenzar de forma unilateral en las extremidades tanto superiores como inferiores (este tipo de inicio suele afectar a 2/3 de la población afectada), o en los clínicamente denominados músculos bulbares (1/3 de los pacientes de ELA) (FIGURA 1) (12).

Los músculos afectados de forma primaria, cuando la enfermedad comienza en las extremidades superiores, son los tenares de la mano dominante, así como los extensores de los dedos, mientras que en el caso de las extremidades inferiores los músculos que se afectan primero son el tibial anterior, así como los isquiotibiales. Por otro lado, cuando el inicio es bulbar, es decir se manifiesta en musculatura inervada por núcleos del bulbo raquídeo, los síntomas más comunes son disartria y disfagia (FIGURA 1) (12).

Normalmente, durante la exploración neurológica se observa una combinación de signos que involucran tanto a las motoneuronas superiores como inferiores. Los principales signos observados cuando hay afectación de las motoneuronas inferiores son la debilidad muscular, la atrofia, fasciculaciones y una reducción del tono muscular. Sin embargo, los signos principales de afectación de las motoneuronas superiores son la hiperreflexia, aumento del tono muscular, enlentecimiento de los movimientos, espasticidad y cambios en el reflejo de Hoffmann (FIGURA 1) (12, 13)

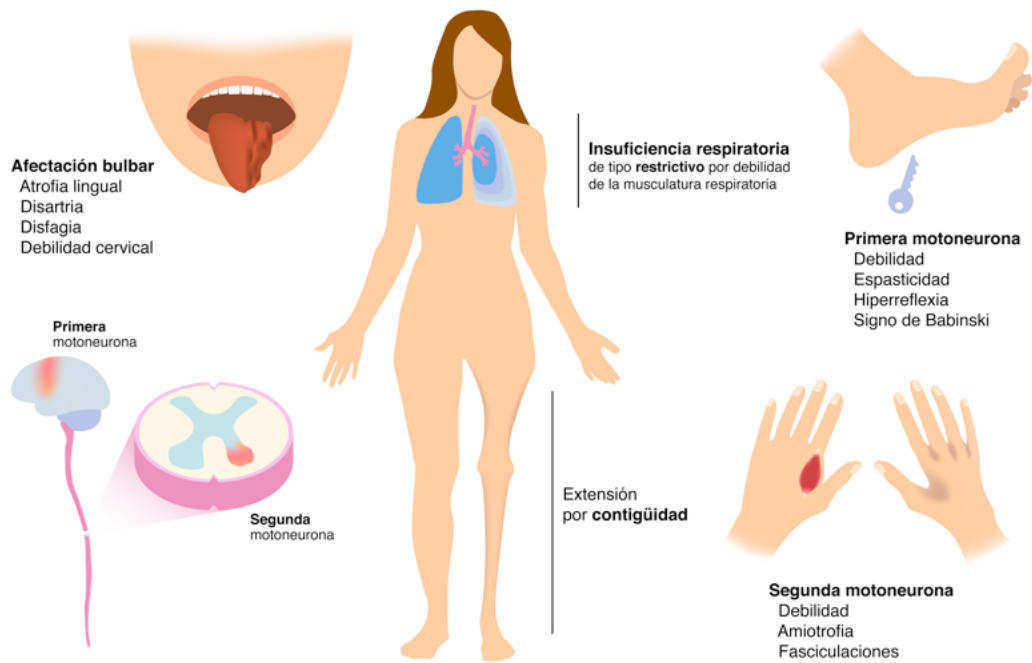


Figura 1: Características Clínicas de la ELA. Tomado de (14).

La mayoría de los pacientes muestran pérdida de peso corporal durante la enfermedad, desde los primeros estadios se puede observar pérdida de grasa y músculo. Si la pérdida de peso es rápida, los pacientes presentarán una peor sintomatología. Por el contrario, los pacientes con un alto índice de masa corporal tienden a presentar una mayor supervivencia (15).

En un principio se consideraba que esta patología era exclusivamente motora, sin embargo, con el paso del tiempo y el descubrimiento de genes asociados a esta enfermedad y otras demencias (TABLA 1), se ha visto que esta patología no solo es motora, sino que también presenta un componente no motor, siendo el deterioro cognitivo el signo más frecuente de estos componentes no motores afectados, principalmente asociado a la Demencia Frontotemporal (DFT).

PATOLOGÍA	CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS	CARACTERÍSTICAS RELACIONADAS
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	<ul style="list-style-type: none"> • Depósitos de β-Amiloide ($A\beta$). • Agregados de fosfo-TAU (p-TAU) intraneuronales. • Incremento de la proteína precursora de amiloide (APP). • Disfunción colinérgica. • Neuroinflamación. • Cambios cognitivos. • Acúmulos de proteínas ubiquitinadas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Alteración del movimiento.
ENFERMEDAD DE PAKINSON	<ul style="list-style-type: none"> • Neuroinflamación. • Acúmulos de proteínas ubiquitinadas. • Acúmulo intracelular de α-sinucleína. • Cuerpos de Lewy. • Pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra. • Alteración del movimiento. 	<ul style="list-style-type: none"> • Disfunción colinérgica. • Cambios cognitivos.
ENFERMEDAD DE MOTONEURONA	<ul style="list-style-type: none"> • Neuroinflamación. • Acúmulo de proteínas ubiquitinadas. • Alteración del movimiento. • Mutaciones en C9ORF72. • Acúmulo intracelular de agregados proteicos (TDP43, FUS, SOD1). 	<ul style="list-style-type: none"> • Incremento de APP. • Acumulación de $A\beta$ y p-TAU. • Cambios cognitivos. • Co-agregación de SOD1 y α-sinucleína en ELA.

Tabla 1: Características típicas y relacionadas entre enfermedades neurodegenerativas. Tomado de (16).

Esto ha hecho que todas estas patologías sean consideradas dentro de un espectro, el espectro ELA-DFT (FIGURA 2). Aproximadamente el 50% de los pacientes de ELA, presentan deterioro cognitivo o conductual y se considera, que el 25% de estos pacientes presentan criterios clínicos de DFT. Conjuntamente a estos cambios cognitivos, histopatológicamente estas patologías también presentan características comunes como las inclusiones citoplasmáticas (17-19). El inicio de los síntomas cognitivos suele preceder a los síntomas motores, sin embargo, suelen descubrirse *a posteriori* (18).

La esperanza de vida en los pacientes con deterioro cognitivo es similar a la de los que solo presentan alteración motora, sin embargo, aquellos que presentan deterioro conductual o ELA-DFT presentan peor pronóstico que los demás casos, siendo la esperanza de vida de unos 2,4 años (18).



Figura 2: Espectro Esclerosis Lateral Amiotrófica-Demencia Frontotemporal. ELA y DFT conforman los estadios finales de un espectro que involucra a las motoneuronas y a las neuronas frontotemporales. Se indican los diferentes estadios dentro del espectro: ELA, ELA con deterioro cognitivo (ELAci), ELA con deterioro conductual (ELAbi), ELA-DFT, DFT-ELA y DFT. Adaptado de (18).

Actualmente existen 2 tratamientos aprobados por la *U.S. Food and Drug Administration* (FDA), el Riluzol y la Edaravone, administrándose de forma oral e intravenosa respectivamente. A pesar de estar aprobados ninguno de ellos es curativo, pero sí han demostrado que aumentan ligeramente la supervivencia. El primero de ellos, el Riluzol es un antagonista del glutamato y se ha demostrado que aumenta la supervivencia en un rango entre los 6 y los 21 meses. Este fármaco ejerce una acción inhibitoria en la liberación del glutamato inactivando los canales de calcio, así como interfiriendo en los eventos posteriores resultantes de la unión del neurotransmisor a los receptores de aminoácidos excitatorios. Por su parte, Edaravone es un antioxidante y un recolector de radicales libres que reduce el estrés oxidativo y como consecuencia reduce la muerte celular. Se desconoce cuál es el mecanismo de acción exacto de este fármaco en la ELA, pero en los pacientes se ha encontrado que preserva la función motora retrasando el deterioro motor (20).

Neuropatología de la ELA

Degeneración de las motoneuronas

Estudios en tejido *post mortem* de pacientes de ELA han permitido evaluar los cambios histopatológicos tanto macroscópicos como microscópicos. Macroscópicamente, los cerebros de pacientes de ELA no presentan alteraciones, sin embargo, cuando los pacientes presentan demencia, sí que se observa atrofia en la corteza frontal y temporal, además, se observa palidez y esclerosis de los haces corticoespinales y corticobulbares. Por otro lado, la médula espinal muestra atrofia en el asta anterior y, por último, se observa atrofia muscular esquelética (21-25).

Microscópicamente, la principal característica observada en los tejidos *post mortem* es la degeneración de las motoneuronas superiores e inferiores. Esta pérdida neuronal ocurre tanto en el asta anterior de la médula espinal, como en núcleos motores del tronco cerebral y las células de Betz de la corteza motora. La región oculomotora suele ser una de las regiones mejor preservadas en relación con esta degeneración neuronal (24). En el caso de la médula espinal, la pérdida neuronal no se reduce a las motoneuronas, sino que también se ven afectados tipos neuronales como las interneuronas (4, 5, 12, 21, 26, 27).

Otra característica observada es la degeneración axonal de las proyecciones desde las motoneuronas superiores (Células de Betz de la capa 5 del área 4 de Brodmann), principalmente en el cuerpo calloso, la cápsula interna, los pedúnculos cerebrales y columnas laterales, entre otros. En las motoneuronas inferiores también se observa esta degeneración axonal, lo cual lidera la denervación muscular (4, 12, 21, 26). La degeneración axonal, es provocada por el entrecruzamiento anormal, así como por la desorientación de los neurofilamentos (28). De forma secundaria a la pérdida axonal, se observa en la médula espinal una pérdida de mielina (5, 21). Por otro lado, en las motoneuronas residuales, se observa cromatolisis central, inclusiones sobre las que se profundizará un poco más adelante, hinchazón del soma y del axón proximal, así como también de las mitocondrias, además, se produce una acumulación de vacuolas y neurofilamentos (29).

Inclusiones

Además de la degeneración neuronal, en la histopatología de la ELA existe otra característica principal, común a todos los tipos de ELA. Este hallazgo son las inclusiones citoplasmáticas en las motoneuronas que no se ven afectadas en el proceso degenerativo (30). El agregamiento de proteínas es un proceso en el cual las proteínas no se pliegan correctamente y esto provoca una autoasociación, que produce la formación de oligómeros y fibrillas mediante la polimerización (31). Existen múltiples formas de inclusiones en la ELA, podemos encontrar cuerpos de Bunina, inclusiones basófilas con forma esférica, inclusiones ubiquitinadas como cuerpos redondos, inclusiones *skein-like* e inclusiones de hialina. Dichas inclusiones, también se pueden categorizar en función de la proteína mayoritaria de la que están compuestas, como puede ser *transactive response DNA-binding protein 43* (TDP43), *chromosome 9 open reading frame 72* (C9ORF72) o superóxido dismutasa 1 (SOD1) (30).

Las inclusiones con forma redonda, ubiquitinadas, *skein-like* o densas, aparecen en todos los casos de ELA. La presencia de estas inclusiones ubiquitinadas sugiere que existe algún problema en otro tipo de proteínas. El mayor componente de estas inclusiones es la TDP43, lo que podría señalar defectos en la vía de degradación lisosomal de proteínas mal plegadas (32). A pesar de que son las inclusiones más comunes de la ELA, están presentes en otras patologías, además de en el envejecimiento normal, lo que parece indicar que podría tratarse también de un proceso fisiológico de la edad (1, 12, 19, 21, 22, 24, 25, 33, 34).

Las inclusiones citoplasmáticas se observan en las motoneuronas residuales, tanto en la corteza frontal, temporal, hipocampo y estriado, así como en la médula espinal. Generalmente las inclusiones neurodegenerativas presentan proteínas como la TAU o α -sinucleína, sin embargo, las inclusiones en la ELA no presentan este tipo de proteínas. Los agregados de TDP43 se encuentran en el 97% de las neuronas afectadas en los casos de ELA y en un 50% en los casos de DFT. Este tipo de inclusiones suelen ir acompañadas de una disminución de TDP43 en el núcleo, donde normalmente se encuentra, translocándose y agregándose en el citoplasma formando dichas inclusiones (12, 19, 21, 22, 24, 25, 33, 34).

Existen diferentes tipos de inclusiones de TDP43, con forma de madeja tanto finas como gruesas, con forma punteada o con forma redonda y densa. Las inclusiones finas y gruesas están presentes tanto en las motoneuronas inferiores como superiores, sin embargo, los otros tipos de inclusiones de TDP43 son más comunes en las motoneuronas del asta anterior de la médula espinal (21). A parte de presentar diversas formas, las inclusiones de TDP43 presentan un patrón específico celular: el 22% de los casos presentan las inclusiones en las células gliales, el 59% las presentan de forma mixta entre las células neuronales y las células gliales y el 7% de los casos las presentan exclusivamente en las células neuronales (35).

En estudios histológicos se han observado inclusiones de SOD1 *wild-type (wt)*, estos agregados de SOD1 también se encuentran en pacientes con mutaciones asociadas a SOD1. Las inclusiones SOD1 presentan una forma similar a los cuerpos de Lewy, conformadas por una sustancia hialinizada y poco afín por tinciones histológicas, que además de ser positivas para ubiquitina y SOD1, también lo son para neurofilamentos fosforilados y algunas chaperonas, y se encuentran situadas en el asta anterior de la médula (21, 36). Las mutaciones en SOD1 asociadas a la ELA provocan que esta proteína sea más propensa a formar agregados, convirtiéndose en la proteína que más se suele ver agregada en estos pacientes (37). En estos casos, este SOD1 agregado no aparece en las células de la corteza motora y no colocalizan con TDP43 (21).

Las mutaciones en *FUS (Fused in Sarcome)* también generan inclusiones citoplasmáticas que presentan formas largas filamentosas, así como granulosas. Histológicamente son ubiquitinadas, pero negativas para TDP43, tanto en las inclusiones citoplasmáticas como en las nucleares en el cerebro y médula espinal de los pacientes (21). Las inclusiones citoplasmáticas de FUS se encuentran en los tejidos donde existe una gran neurodegeneración evidenciada con una gran pérdida neuronal (38). En la mayoría de los casos, las inclusiones de FUS aparecen asociadas a mutaciones de esta proteína, aunque algún estudio indica también que se han encontrado en casos esporádicos. Que esto ocurra, está relacionado con que los mecanismos que subyacen a la acumulación citoplasmática de FUS no están esclarecidos y es posible que existan otros factores, además de las mutaciones que causen esta acumulación (39).

Se ha descrito que existen expansiones del hexanucleótido GGGGCC en el gen *C9ORF72* que neuropatológicamente también generan agregados, siendo ubiquitina positivos, p62 (nucleoporina 62) positivos, y siendo la mayoría TDP43 negativos. Otra característica neuropatológica de este gen es la producción de repeticiones de dipéptidos (DPR), siendo los principales poli GA (Dipéptido poli Glicina-Alanina), poli GP (Dipéptido poli Glicina-Prolina), poli GR (Dipéptido poli Glicina-Arginina), poli PA (Dipéptido poli Prolina-Alanina) y poli PR (Dipéptido poli Prolina-Arginina) (40). Cuando estos dipéptidos se forman, son capaces de agregarse tanto en inclusiones citoplasmáticas como en nucleares, dentro de las neuronas (40). Los agregados de DPR se localizan en las regiones frontal, occipital o temporal, en la corteza motora, así como en las regiones subcorticales, cerebelo y médula espinal (21). La acumulación de poli GA es el principal causante de los agregados de DPR, y se detecta de forma predominante en la corteza frontal, asociándose a la neurodegeneración de esta zona, generando inclusiones citoplasmáticas, lo que daña el crecimiento de las neuritas y activa la muerte neuronal a través de caspasa 3 (40).

Otro tipo de inclusiones que se encuentran en los tejidos cerebrales y medulares de pacientes de esta enfermedad son los cuerpos de Bunina. Son inclusiones eosinófilas pequeñas, de aproximadamente 3-6 μm con forma ovalada y que se encuentran en el citoplasma de las motoneuronas inferiores, aunque también se han encontrado en las dendritas; raramente se encuentran en las células de Betz o en las regiones oculomotoras. Es más normal verlas en la región lumbar de la médula que en la región torácica o cervical y suelen presentarse al inicio de la enfermedad. Mediante microscopía electrónica se estudió su estructura, estas inclusiones están formadas por un material electrodensito de aspecto amorfo el cual se rodea de estructuras tubulares y vesiculares. Los pacientes que presentan demencia suelen presentar cuerpos de Bunina mayores que los que no la presentan (21, 41-43).

Histológicamente los cuerpos de Bunina son positivos para transferrina, cistatina C y parcialmente colocalizan con periferina. En cuanto a la tinción con ubiquitina, existe cierta controversia debido a que la mayoría de los estudios indican que los cuerpos de Bunina son negativos para ubiquitina, a pesar de ello, algunos investigadores muestran que un pequeño porcentaje de estas inclusiones pueden ser positivas para ubiquitina. Estas inclusiones también son negativas para marcadores relacionados con la neurodegeneración. Su función biológica, así como el origen de su formación es todavía desconocido, no obstante, en pacientes de ELA se encuentran tanto en las motoneuronas degeneradas como en las que presentan un aspecto normal, lo que hace pensar que son un cambio primario en estas motoneuronas (21, 41-43).

Neuroinflamación

La neuropatología de esta enfermedad también está caracterizada por la neuroinflamación, que se define como astrogliosis reactiva, microgliosis e infiltración de linfocitos en el Sistema Nervioso Central (SNC) (44-47). En el SNC, existen dos categorías de poblaciones celulares, están son las neuronas y las células gliales. Las células gliales, no producen impulsos eléctricos y son consideradas como células de soporte para las neuronas. Estas células son principalmente los astrocitos, la microglía y los oligodendrocitos y son capaces de regular la actividad neuronal (48). Las células gliales, participan en una red de señalización con las neuronas, liberando citoquinas, neurotransmisores, factores tróficos y exosomas que puede ser desencadenada por la agregación proteica citoplasmática (44).

La neuroinflamación, es un proceso fisiológico que, inicialmente, presenta un papel protector o de defensa, eliminando o inhibiendo patógenos. Entre sus efectos beneficiosos podemos encontrar la reparación tisular o la eliminación de los desechos celulares. Pese a su papel fisiológico, cuando la neuroinflamación se cronifica, termina por afectar a estructuras celulares sanas e inhibe los procesos de regeneración, terminando por contribuir al desarrollo de patologías como la ELA (46, 48), además de contribuir a la difusión de la enfermedad (44).

En los siguientes apartados se va a proceder a describir los diferentes tipos celulares implicados en el proceso neuroinflamatorio, explicando tanto su función natural como su papel en la fisiopatología de la ELA.

Microglía

La microglía es considerada la principal célula de la inmunidad innata en el SNC, de forma que está distribuida de forma ubicua en todo el cerebro y médula espinal (48, 49), representando entre el 5 y el 12% de las células gliales (50). La microglía deriva del saco vitelino y migra al cerebro durante el desarrollo embrionario (29, 50-53). La función principal de la microglía es fagocitar residuos celulares, procesar y presentar antígenos a los linfocitos y secretar citoquinas y quimioquinas durante el proceso inflamatorio (51).

Bajo condiciones fisiológicas, la microglía se encuentra en un estado quiescente (52, 54) mostrando una morfología altamente ramificada, lo que permite la monitorización del ambiente cercano para así mantener la homeostasis mediante la extensión o retracción de sus ramificaciones, además participa en la remodelación sináptica, la neurogénesis y modula las redes neuronales (49, 50, 53-55). Cuando existe una deficiencia en la función neuronal, la microglía es la encargada de inducir la muerte celular (54). Además, presentan receptores de reconocimiento de patrones como los receptores *Toll-Like* (TLR), los cuales están involucrados en diversas enfermedades neurodegenerativas (29).

Cuando existe un estímulo, la microglía pasa del estado de reposo, a un estado activado, adquiriendo una morfología ameboide con un cuerpo redondo con ramificaciones cortas y finas (54, 55). La microglía puede ser activada por diversos tipos de estímulos o factores que pueden ser tanto exógenos (patrones moleculares asociados a patógenos, lipopolisacáridos bacteriales, material genético de patógenos o virus), como endógenos (patrones moleculares de daño producidos por las células bajo estrés, agregados de proteínas o placas seniles, o factores secretados por otras células gliales) (29, 54).

Dependiendo de qué tipo sea el estímulo que reciba, la microglía puede ser activada de dos formas diferentes, una clásica también denominada M1 o una alternativa denominada M2 (29) (FIGURA 3). El proceso de discriminación entre las señales dañinas o protectoras es uno de los pasos más complejos, ya que permite a la microglía no luchar contra tejidos sanos (54). Los fenotipos M1/M2 son considerados como los extremos de un espectro de activación, y dentro del tejido se encuentran diversos estadios intermedios coexistiendo a la vez (48, 54).

La microglía M1 es considerada neurotóxica ya que al activarse responde activando una respuesta de células T neurotóxicas y liberando citoquinas proinflamatorias como interleucina 6 (IL-6) o factor de necrosis tumoral (TNF α), quimioquinas, así como especies reactivas de oxígeno (ROS). Por el contrario, la microglía M2 se considera neuroprotectora ya que, al activarse, bloquea la señal proinflamatoria y produce altos niveles de citoquinas antiinflamatorias y factores neurotróficos como interleucina 4 (IL-4) o factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF1) o Arginasa 1, además se encarga de la fagocitosis y de la reparación tisular (29, 49, 52, 53, 55-57).

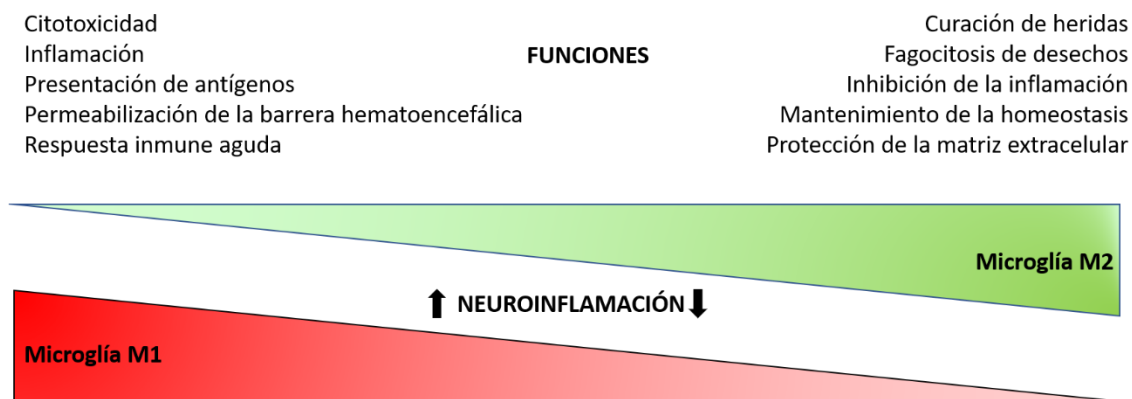


Figura 3: Espectro de polarización de la microglía activada. Adaptado de (54).

El líquido cefalorraquídeo de pacientes de ELA muestra una desregulación de citoquinas anti y proinflamatorias y de factores tróficos. Por otro lado, en tejido *post mortem*, se han encontrado infiltrados de linfocitos T, tanto CD4+ como CD8+ (58, 59). Otros estudios neuropatológicos han demostrado que los hallazgos de microgliosis y astrogliosis ocurren en los estadios primarios de la enfermedad (44). Esta evidenciada microgliosis, es observada en regiones con una pérdida significativa de motoneuronas, entre ellas la corteza motora, donde se observa un aumento de la microglía en las vecindades de las células de Betz, los núcleos motores del tronco cerebral, el tracto corticoespinal y el asta ventral de la médula espinal (56, 60). Además, mediante tomografía de emisión de positrones (PET) se ha demostrado *in vivo* que los pacientes de ELA presentan una activación microglial que no estaba presente en las personas sin la patología de ELA. La activación de la microglía se incrementa conforme la severidad de los síntomas es mayor y correlaciona con la localización del daño neuromotor en la corteza motora, el tracto corticoespinal y médula espinal (29, 56, 59).

Al inicio de la patología, en respuesta al daño neuronal, se produce una microgliosis, así como una activación neuroprotectora de la microglía encontrándose en estado M2, sin embargo, la acumulación de proteínas mal plegadas, así como el adenosín trifosfato (ATP) liberado de las motoneuronas dañadas, o la activación del factor nuclear kappa β contribuyen a las respuestas inflamatorias neurotóxicas, lo que provoca un cambio de estado de la microglía, pasando a encontrarse en estado M1 hiperactivado. Esto conlleva a que en los estadios finales de la enfermedad la microglía sea tóxica para las motoneuronas (45, 49, 60, 61).

Astroцитos

Los astroцитos son la clase más abundante de células gliales en el SNC, constituyendo en torno al 20-40% del total de las células del cerebro (45, 62-64). Su origen está en el neuroepitelio derivado de la glía radial. Los astroцитos pueden desarrollarse a partir de progenitores gliales intermedios, mediante proliferación de astroцитos diferenciados y también de células *Neuron-glia antigen 2* (NG2) (65).

Los astroцитos no son un tipo celular uniforme, es decir, su función y morfología variará dependiendo de la localización, de los subtipos y su estado de desarrollo (66, 67). Los astroцитos humanos, están caracterizados por una alta expresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), la cual aumenta con la edad. Estructuralmente existen 4 clases de astroцитos en el cerebro humano: los astroцитos interlaminares que se localizan en las capas 1 y 2, los astroцитos protoplasmáticos localizados en las capas 3 y 4 de la corteza, proyecciones varicosas en las capas 5 y 6 y por último la astroglía fibrosa en la materia blanca (FIGURA 4) (68).

Los astrocitos protoplasmáticos son el tipo de astrocito más abundante tanto en el cerebro como en la médula espinal de los mamíferos, con una densidad aproximada en roedores de entre 10.000 y 30.000 por mm^3 . Generalmente presentan un soma pequeño con ramificaciones notablemente largas, que se distribuyen uniformemente a lo largo de todo el soma, pero esto puede verse modificado según la región anatómica en la que se encuentren. Este tipo de astrocitos presentan una de sus ramificaciones en contacto con los vasos sanguíneos, formando los pies astrocitarios perivasculares y suelen localizarse en la vecindad de las sinapsis neuronales (65, 66).

Los astrocitos fibrosos suelen localizarse en la materia blanca del cerebro y de la médula espinal, el nervio óptico y en la capa nerviosa de la retina. Los somas de estos astrocitos se organizan en filas entre los haces axonales y, además, presentan proyecciones largas orientadas en la dirección de los haces axonales. Se encuentran físicamente en contacto con los oligodendrocitos y juegan un papel crucial en la mielinización, y sirven de soporte para la materia blanca (65, 66). El papel metabólico de estos astrocitos es claro debido a su cercanía a la vasculatura, sin embargo, no modula la actividad neuronal debido a la ausencia de sinapsis en la materia blanca (68).

Los astrocitos intralaminares suelen aparecer durante los primeros meses de vida y se originan a raíz de precursores de astrocitos, no desde la glía radial. Se caracterizan por un cuerpo celular pequeño y de forma esferoide que se localiza en la capa 1 de la corteza, y por varias proyecciones pequeñas en conjunto, con una o dos de mayor tamaño que se extienden hasta las capas 2 y 4. Las porciones terminales de estas proyecciones presentan una forma de botón. Las proyecciones de este tipo de astrocitos contactan con los vasos sanguíneos. Este tipo de astrocitos se ha visto alterado en enfermedades neurodegenerativas (69).

Los astrocitos con proyecciones varicosas son exclusivos del cerebro humano y no han sido encontrados en los periodos neonatales. Se localizan en las capas 5 y 6 de la corteza y se caracterizan por unas fibras largas que contienen varicosidades distribuidas cada 10 μm . Presentan entre 1 y 5 proyecciones largas, que se distribuyen hacia todas las direcciones de las capas de la corteza y suelen terminar en el neuropilo o en los vasos sanguíneos, donde están en contacto directo con las paredes vasculares. Apenas se localizan en las sinapsis (65, 68).

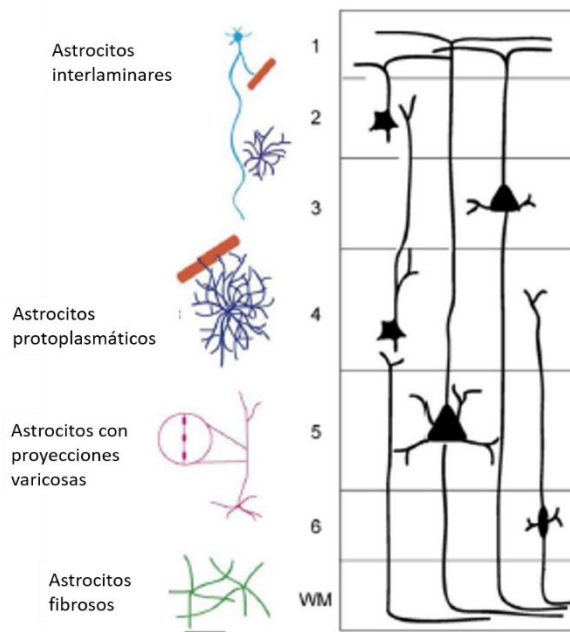


Figura 4: Tipos de astrocitos. Modificado de (68).

En un primer momento se consideraba que los astrocitos presentaban funciones pasivas, sin embargo, recientemente se ha descubierto que presentan un papel activo y esencial en la homeostasis cerebral, así como en el procesamiento de la información (48, 70). A pesar de que no propagan potenciales de acción, los astrocitos expresan canales de sodio y potasio (70) y, a nivel sináptico, responden a los neurotransmisores liberados, mediante la elevación de los niveles de calcio intracelular (71). Sus principales funciones fisiológicas son: mantener la homeostasis molecular y metabólica del SNC, así como contribuir a la homeostasis sistémica, mantener la neurotransmisión y regulación de las sinapsis, definir la citoarquitectura de la materia gris y actuar como primera línea de defensa en el SNC (63, 65, 72). Esto hace que estas células presenten una alta heterogeneidad morfológica, transcripcional, funcional y fenotípica (FIGURA 5) (62).

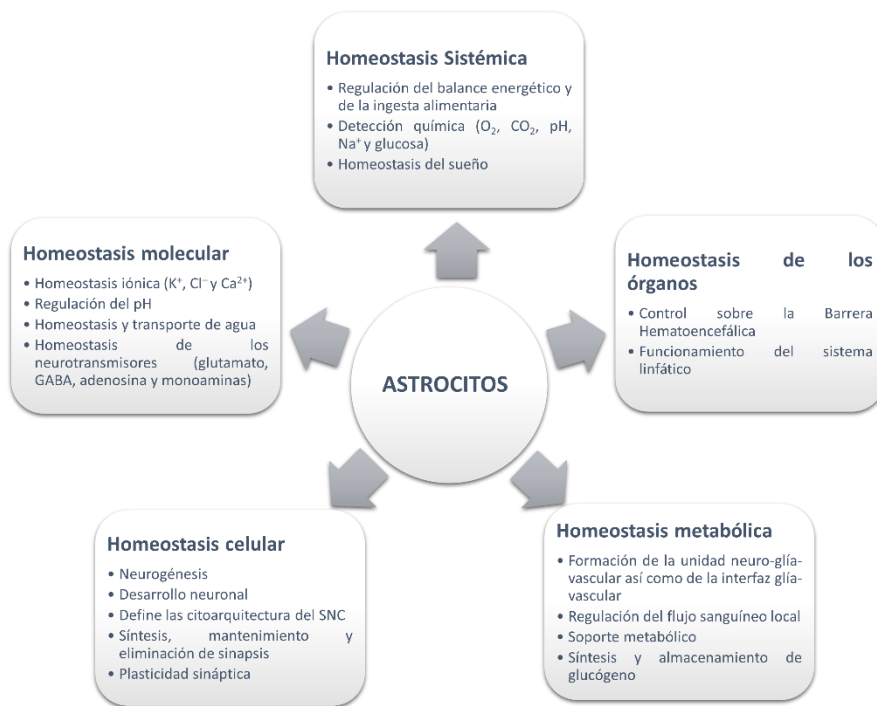


Figura 5: Funciones fisiológicas de los astrocitos. Modificado de (65).

Los astrocitos, responden frente a cualquier tipo de daño en el SNC de diversas formas, ya sea variando la expresión génica, estructura celular o función. Estas respuestas son conocidas como astrogliosis (73, 74). Durante este proceso, los niveles de GFAP aumentan, así mismo se produce una hipertrofia de las ramificaciones (66, 75). Funcionalmente la astrogliosis, aumenta la neuroprotección y el soporte trófico de las neuronas dañadas, aísla el área dañada del resto del tejido sano, reconstruye el daño producido en la barrera hematoencefálica y es capaz de facilitar la remodelación de los circuitos cerebrales (75).

Al igual que sucedía con la microglía, los astrocitos reactivos pueden jugar un papel dual en el SNC durante la patología, o pueden promover la neuropatología presentando un fenotipo A1, provocando una sobre-regulación de genes que pueden ser tóxicos para las sinapsis y las neuronas, además de inducir factores proinflamatorios. Normalmente, este fenotipo es inducido por la microglía M1. Por el contrario, pueden también presentar un papel neuroprotector con fenotipo A2, estos aumentan factores neurotróficos que promoverán la reparación del daño sináptico, así como la supervivencia neuronal (48, 62, 64, 76, 77).

En la ELA, los astrocitos presentan dos papeles. Por un lado, secretan factores neurotóxicos, lo que contribuirá a la muerte neuronal. Por otro lado, en esta enfermedad, los astrocitos pierden alguna de sus funciones críticas y esto implica su propia degeneración. Esto tiene como consecuencia que las neuronas motoras pierden el soporte que les proporcionan los astrocitos, lo que puede acelerar su muerte (64, 78). Se ha visto que los astrocitos A1 promueven la agregación mediante la liberación de Factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1). Además, liberan citoquinas proinflamatorias, y presentan un aumento de ROS, lo cual contribuye activamente a la patología (64).

Una de las principales funciones de los astrocitos es mantener unos niveles bajos de glutamato extra-neuronal, esto lo realizan mediante el aclaramiento de este neurotransmisor del espacio sináptico, a través del transportador *Excitatory Amino Acid Transporter-2* (EAAT2)/*Astrocytic Glutamate Transporter 1* (GLT1). En la ELA, esta retirada del glutamato del espacio sináptico se encuentra comprometida, lo que lideraría una sobreestimulación de los transportadores de glutamato, los cuales se han visto disminuidos en los pacientes de ELA y en consecuencia la muerte de las motoneuronas. Por otro lado, la astrogliosis en la ELA presenta déficits funcionales tales como defectos mitocondriales y una capacidad reducida de liberar metabolitos como el lactato, liberándose por el contrario factores tóxicos (FIGURA 6) (62, 78-80).

Al igual que sucede con las motoneuronas, a lo largo de la patología los astrocitos también presentan inclusiones, lo que los lleva a un estado de degeneración. Estos astrocitos degenerativos, ya se pueden encontrar en los primeros estadios de la enfermedad, aumentando conforme avanza la patología (78, 80).

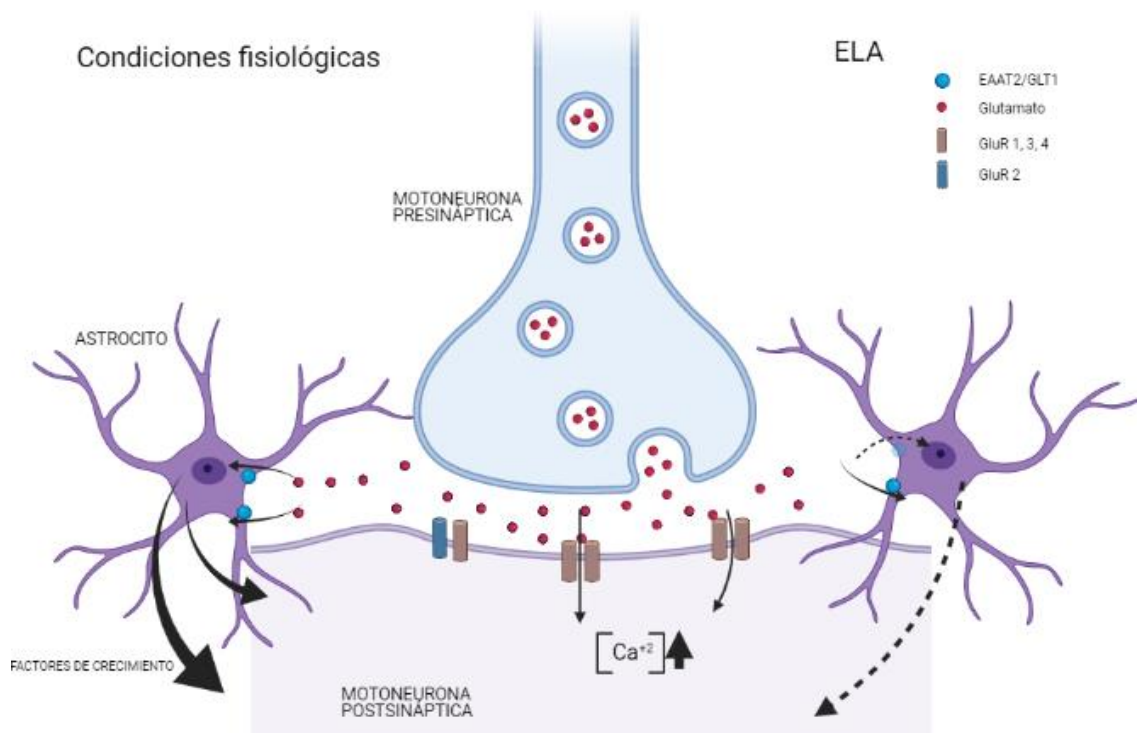


Figura 6: Representación esquemática de las interacciones entre las motoneuronas y los astrocitos. Modificado de (79).

Oligodendrocitos

Los oligodendrocitos (OLs) son otro tipo de células de neuroglia (78, 81, 82). Este tipo celular se genera tras un proceso de especificación, proliferación, migración y diferenciación durante el desarrollo del cerebro, el nervio óptico y la médula espinal (83). Derivan de las células progenitoras de oligodendrocitos (OPCs), las cuales tras finalizar el desarrollo se mantienen en el SNC adulto distribuidas principalmente por la materia blanca (83). Estas células presentan un origen diferente según el destino que vayan a tener. Si su destino es la médula espinal, los OLs derivan de un dominio especializado de la zona ventricular ventral, sin embargo, si su destino es el cerebro, los oligodendrocitos derivan de la eminencia gangliónica medial y del área entopeduncular anterior del cerebro anterior (83, 84). Por otro lado, la oligodendrogénesis no solo ocurre durante la gestación, sino que en el cerebro adulto también se siguen produciendo los oligodendrocitos, pudiendo ayudar estos en la reparación de la mielina (85).

Las OPCs se distinguen de otros tipos celulares debido a sus características electrofisiológicas, ya que presentan una capacitancia pequeña, canales de sodio y potasio dependientes de voltaje y no son capaces de generar potenciales de acción (86). Por otro lado, los OLs maduros presentan cuerpos pequeños con un núcleo que presenta altas cantidades de cromatina, sus extensiones no presentan fibras sino que están formadas por gránulos citoplasmáticos (87). Existen 4 tipos de OLs: el tipo I genera diferentes segmentos de mielina en axones de pequeño diámetro en diversas orientaciones. El tipo II es similar al I, pero en este caso los segmentos de mielina se generan de forma paralela. El tipo III envuelven los axones de mayor diámetro y por último el tipo IV presentan un cuerpo que se yuxtaponen a un solo axón de gran dimensión (87).

La principal función de los OLs es generar la mielina en el SNC (83, 84). Este tipo celular es indispensable para que las neuronas funcionen correctamente ya que les proporcionan soporte nutricional (63, 88, 89), por ejemplo, transformando la glucosa en lactato o piruvato, aportándoselo mediante transportadores de ácidos monocarboxílicos (63, 90).

La vaina de mielina es una membrana plasmática glial que se modifica y extiende para envolver los axones y así permitir una conducción nerviosa más rápida además de mantener la integridad de estos axones (82, 91, 92). La vaina de mielina recubre a los axones de forma discontinua, lo que forma los nódulos de Ranvier en las regiones intermedias entre dos vainas, siendo esta región rica en canales de sodio y potasio dependientes de voltaje. Esta conformación permite una conducción saltatoria del potencial de acción, lo que permite una mayor velocidad en la conducción de dicho potencial de acción (82).

Los OLs son capaces de sintetizar factores como el factor neurotrófico ciliar, IGF-1, entre otros factores neurotróficos de soporte para las neuronas, lo que hace que estos OLs presenten un papel neuroprotector. Es por ello que cuando estos OLs mueren, se produce una desmielinización axonal, lo que conlleva a un bloqueo de la conducción de los potenciales de acción axonales (89). Por lo cual se considera que este tipo celular, cuando ve alterada su función contribuye a las enfermedades neurodegenerativas a través de los mecanismos de desmielinización o al soporte metabólico de las neuronas (63).

En los pacientes de ELA, se ha observado pérdida de mielina en la materia gris de la corteza y del asta ventral de la médula espinal (63, 93, 94). Además, los OLs en la ELA presentan inclusiones de TDP43, FUS y proteína tirosina quinasa receptora erbB-4 (ErBB4). La acumulación de TDP43 en el citoplasma de los OLs lleva aparejada defectos y reducción de las vainas de mielina con la consecuente disminución de la mielinización en el SNC. Además, estos OLs con inclusiones entran en el proceso de apoptosis, esto hace que se vean aumentadas las OPCs, sin embargo, estas OPCs no maduran correctamente debido a la sobrerregulación del receptor de nucleótido de uracilo/cisteinil leucotrieno (GPR17), lo cual impide la maduración final y como consecuencia no se ve afectado el número ni el tamaño de las motoneuronas de las vecindades. Por su parte la agregación de FUS afecta a la materia blanca de la médula espinal, lo que conlleva una desregulación de los genes asociados a la mielinización. Todos estos acontecimientos ocurren previos a la degeneración de las motoneuronas y directamente contribuyen al progreso de la enfermedad (63, 93, 95).

Mecanismos fisiopatológicos

A pesar de que se ha investigado mucho sobre esta enfermedad, sigue siendo de etiología incierta, es decir no se conoce una causa por la cual se desencadena la enfermedad, sobre todo en los casos esporádicos. Se considera que existen múltiples factores o mecanismos que podrían iniciarla y contribuir a la progresión de la misma.

En los próximos párrafos se expondrán los mecanismos que podrían contribuir a la patogénesis de la ELA.

Estrés oxidativo y Disfunción mitocondrial

El estrés oxidativo, se produce debido a un desequilibrio entre la producción y la eliminación de las ROS (96, 97), cuando esto sucede se producen daños en el ADN (ácido desoxirribonucleico), proteínas o fosfolípidos, lo que deriva en muerte celular (98-100).

La pared mitocondrial contiene la cadena respiratoria, que consume entre el 85-90% de total del oxígeno consumido por el cuerpo (97). Durante el proceso de producción de ATP en la mitocondria, se producen también la mayoría de las ROS, así como radicales superóxido producto de la respiración celular (98, 99). A pesar de que las ROS provocan efectos dañinos, no siempre estas especies son tóxicas, gracias a que funcionan como activadores de cascadas de señalización, que activan o inhiben procesos celulares como la proliferación, diferenciación, metabolismo y apoptosis, además de participar en procesos de aprendizaje y memoria (97).

El estrés oxidativo se ha visto implicado en numerosas enfermedades neurodegenerativas, entre ellas la ELA, ya que el SNC es más susceptible que otros tejidos a las ROS (28, 101). En el tejido cerebral y médula espinal de pacientes de ELA, se han encontrado altos niveles de radicales libres, así como daño oxidativo, esto también se ha visto en muestras de LCR (líquido cefalorraquídeo), suero y orina (28, 99, 100, 102, 103). En esta enfermedad el estrés oxidativo se propuso, en un primer momento, como un factor en la iniciación de la patogénesis (98), sin embargo, esta circunstancia es algo difícil de determinar debido a que no es posible evaluar esto en los estadios primarios de la enfermedad en humanos, ya que en estas fases no se presentan síntomas (99) .

Los fallos mitocondriales como hinchazón o la vacuolización podrían explicar algunos de los síntomas clínicos que presentan los pacientes de ELA como pueden ser las fasciculaciones, la hiperexcitabilidad neuronal y la vulnerabilidad de las motoneuronas (22, 101, 104); además, activan señales proapoptóticas, lo que podría liderar la degeneración de las motoneuronas. (96) Los fallos en la cadena respiratoria mitocondrial son detectados en los músculos e hígado de pacientes de ELA-esporádica (ELA-E) (103).

La principal función de SOD1 es proteger a las células de la toxicidad de las ROS gracias a su actividad antioxidante (105). Las mutaciones en *SOD1* podrían tener un papel primordial en los fallos de la cadena respiratoria de la mitocondria, debido a las alteraciones en su función superóxido dismutasa y a que esta enzima se acumula en los espacios intermembranales de la mitocondria, favoreciendo su mal funcionamiento uniéndose a los canales aniónicos dependientes de voltaje, provocando la despolarización de la membrana e impidiendo el buen funcionamiento de la cadena respiratoria (22, 101, 104, 106).

Además, se ha visto que alguna de estas mutaciones aumenta la actividad de los complejos I y III de la mitocondria en la corteza motora, esta hiperactivación eleva la producción de ROS y explicaría los altos niveles de estrés oxidativo observados en los pacientes de ELA (96, 103).

Otro de los aspectos que se ven afectados por las mutaciones de *SOD1* y la disfunción mitocondrial es el metabolismo, ya que se ha observado un hipermetabolismo en los pacientes de ELA y que la ingesta de una dieta rica en grasas podría aumentar la supervivencia. A pesar de que se desconocen las causas que provocan este hipermetabolismo, este se ha relacionado con la toxicidad en la ELA, lo que podría influir en la muerte de las motoneuronas del músculo esquelético, sugiriendo que los fallos mitocondriales serían primordiales para la neurodegeneración en esta patología (104, 107).

Por otro lado, el estrés oxidativo también favorece la agregación de proteínas como TDP43 o FUS (22, 98). Se han observado mutaciones en *FUS* relacionadas con la fragmentación de las mitocondrias y una elevada producción de ROS (96). Por su parte las mutaciones en *C9ORF72*, al igual que las de *SOD1*, provocan errores en la cadena respiratoria, en este caso en el complejo V, lo que aumenta la ubiquitinación y degradación (96).

Desregulación del tráfico axonal

El transporte axonal mantiene el tráfico constante de metabolitos entre el soma de las neuronas y el terminal sináptico, además de encargarse del reciclaje de las proteínas agregadas o mal plegadas, para mantener así la homeostasis neuronal. Las neuronas están altamente polarizadas, por lo que el buen funcionamiento del transporte axonal es vital para el mantenimiento de las funciones fisiológicas (98, 108, 109).

El transporte axonal cuenta con microtúbulos que actúan como la vía citoesquelética del transporte, como proteínas motoras encargadas del transporte en sí, y como los adaptadores que unen el metabolito a transportar a las proteínas motoras. El transporte axonal se divide en transporte axonal lento para proteínas solubles o componentes citoesqueléticos o, transporte rápido para organelas, vesículas o ARNs (ácido ribonucleico) (108). Las principales proteínas motoras son la kinesina, encargada del transporte anterógrado y la dineína, encargada del transporte retrógrado (28, 104).

Tanto la conducción de los impulsos eléctricos como el mantenimiento estructural del axón y el transporte axonal son procesos altamente regulados y ligados a la estructura de los neurofilamentos. Los neurofilamentos son filamentos intermedios específicos de las neuronas resistentes a la elongación, y conforman heterotrúmeros compuestos por neurofilamentos de cadena ligera, media o alta (96). Además, son la proteína citoesquelética más abundante de las motoneuronas y determinan el diámetro del axón (28, 101, 104, 110), uniéndose con los filamentos de actina y microtúbulos construyendo una red que mantiene la estructura axonal (96).

Numerosos estudios han determinado la relación entre la desregulación del transporte axonal y las enfermedades neurodegenerativas, debido a las mutaciones presentadas en los genes que codifican a las proteínas encargadas de este transporte (108). Esto es debido a que como se ha comentado anteriormente, este transporte axonal es fundamental para el funcionamiento y supervivencia de las neuronas (109).

En el caso de la ELA, está demostrado que la retracción axonal y la denervación ocurren previa a la pérdida de los somas y, que los mecanismos axonales determinan el fenotipo en esta enfermedad. Además, el deterioro del transporte axonal contribuye a la patogénesis de esta enfermedad (5, 101).

En los pacientes, se observa un descenso de los neurofilamentos de cadena ligera codificados por el gen *NEFL* (5), además, los neurofilamentos presentan tanto una localización como una acumulación aberrante, afectándose por ello el transporte axonal (28, 98, 102, 104). No se conoce el mecanismo por el cual los neurofilamentos se agregan, pero se cree que la hiperfosforilación podría jugar un papel importante (28, 110). Por otro lado, se observa una desorganización de las redes de neurofilamentos en los pacientes (96). La disfunción de los neurofilamentos se considera un aspecto modificador de la severidad, pero no como un agente causal (104).

TDP-43 facilita el transporte del ARNm (ARN mensajero) a través del transporte axonal, y se ha visto que esta proteína podría estar involucrada en los defectos en el transporte observados en esta patología (98, 111). Otras mutaciones, como las del gen *Profilin 1 (PFN1)*, que regula la polimerización de la actina, también se han visto relacionadas con la ELA, ya que, como consecuencia de la no polarización de esta proteína, la unión a los microtúbulos puede verse afectada y como consecuencia el transporte, tanto anterógrado como retrógrado (5, 12, 22, 96, 104). El deterioro del transporte axonal también se ha visto en pacientes de ELA, tanto esporádica como familiar, cuyas mutaciones no sucedían en los genes relacionados con el citoesqueleto (96).

Excitotoxicidad mediada por glutamato

La excitotoxicidad es un proceso en el cual se produce una toxicidad mediada por los neurotransmisores excitatorios, mayoritariamente el glutamato, debido a que se produce respuesta celular deteriorada frente a esta estimulación excitatoria, y esto activará la cascada de neurotoxicidad que liderará la muerte celular (112, 113). Esto puede suceder debido, tanto a una alta actividad en las neuronas presinápticas como a una respuesta anormal de la neurona postsináptica, así como a ambos procesos (112).

El sistema glutamatérgico es esencial para el buen funcionamiento del cerebro, de hecho, el 40% de las sinapsis del SNC son glutamatérgicas, por lo que el glutamato es un neurotransmisor esencial para la comunicación neuronal y para funciones como el aprendizaje o la memoria (113). El glutamato es el neurotransmisor excitatorio más abundante presente en el SNC, liberado mediante vesículas sinápticas, tras lo cual estimula la activación de receptores tanto ionotrópicos como metabotrópicos en el terminal postsináptico. Los niveles de este neurotransmisor en el SNC son más altos que en el resto del cuerpo, concretamente en el cerebro hay una concentración de 6 $\mu\text{mol/g}$, sin embargo, los niveles extracelulares se mantienen en niveles bajos (98, 114, 115).

Uno de los procesos más importantes para el correcto funcionamiento del cerebro es el aclaramiento de este glutamato en las sinapsis, esto se produce a través de los receptores EAAT2 presentes en los astrocitos (114-116). Cuando esto no sucede, los receptores de glutamato se sobre-activan lo que deteriora los terminales postsinápticos, las dendritas y los cuerpos neuronales (115). A diferencia de otras enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer o la enfermedad de Huntington, en el tejido neuronal de los pacientes de ELA se han encontrado defectos en la señalización del glutamato, además de un aumento del glutamato en el LCR. Estos defectos fueron atribuidos a la pérdida del transportador EAAT2 en los astrocitos (96, 104).

Por otro lado, un exceso de glutamato podría derivar en una activación anormal de los receptores AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico), lo que provocaría un flujo excesivo de calcio hacia la neurona postsináptica y esto lideraría un disparo excesivo de potenciales de acción lo que aumentaría la producción de ROS (96, 104, 112).

Las mutaciones en SOD1, han demostrado que provocan un aumento de liberación de glutamato, hiperexcitabilidad de las motoneuronas y de las interneuronas y que esto sucedía dos o tres meses antes del inicio de la degeneración de las motoneuronas y de los síntomas (96, 112).

Por otro lado, estudios electrofisiológicos demostraban la alteración de la señalización por glutamato debido a las alteraciones en las motoneuronas corticales y espinales, ya que se observaba la aparición de fasciculaciones, provocadas por las descargas espontáneas de las motoneuronas en las fibras musculares que inervan (112).

Alteraciones en el metabolismo y procesamiento del ARN

Otro de los mecanismos alterados en esta patología es el procesamiento del ARN. Este es uno de los aspectos que más interés está generando en los últimos años, gracias al descubrimiento de genes como *TARDBP* (*TAR DNA Binding Protein*) y *FUS*, ambos relacionados con el procesamiento del ARN (101).

Las proteínas de unión al ARN son unas proteínas que se encargan de controlar todos los procesos del metabolismo del ARN, es decir, participan regulando la transcripción, el procesamiento, su localización y funciones, así como su posterior degradación. La patogénesis de diversas enfermedades neurodegenerativas, entre ellas la ELA, se ve influenciada por la desregulación de este tipo de proteínas (98, 100).

La desregulación de estas proteínas causa patogénesis en la ELA mediante dos mecanismos, la alteración del metabolismo del ARN y la pérdida de la homeostasis proteica (100). Como se ha comentado anteriormente, estas proteínas participan en muchos procesos, por lo que su desregulación altera diferentes procesos como la expresión génica, los patrones de *splicing*, la exportación nuclear del ARNm, así como su transporte y traducción. Todo ello conllevaría que las proteínas posean una localización aberrante, así como interacciones o modificaciones post-transcripcionales defectuosas, plegamientos defectuosos, agregaciones de proteínas y cambios en la dinámica de gránulos (98, 100, 114).

Uno de estos procesos alterados observados en la ELA es la formación de ARN *foci* aberrantes, principalmente relacionado con las expansiones del hexanucleótido G₄C₂. Estas expansiones lideran una transcripción bidireccional que implica la formación de estos ARN *foci*, los cuales secuestran a las proteínas de unión al ARN alterando su localización y en consecuencia, el metabolismo del ARN (98, 100, 106, 117). En estudios realizados en tejidos *post mortem* de pacientes de ELA se ha encontrado que prácticamente el 80% de las neuronas y casi ¼ de las células gliales de la región motora del cerebro y de la médula espinal presentaban ARN *foci* antisentido. En las regiones extramotoras estos niveles eran todavía más altos (96).

Los defectos en el procesamiento también se relacionan con otros mecanismos como la excitotoxicidad mediada por glutamato. Esto es debido a que, en algunos casos de ELA, se ha visto que un defecto en este procesamiento del ARN en los astrocitos provoca una disminución en los niveles del transportador EAAT2 (104, 118).

Los gránulos de estrés son organelas sin membrana que participan en el metabolismo del ARN cuando la célula está sometida a situaciones de estrés. Sus principales componentes son las proteínas de unión a ARN. Este tipo de estructuras presentan un patrón transitorio, es decir, se forman en respuesta al estrés celular, sin embargo, un estrés crónico puede provocar que estos gránulos se conviertan en permanentes. Una de sus funciones es inhibir la traducción mediante el secuestro del ARN. Cuando estas estructuras son permanentes, pueden alterar su composición y formar un lugar propicio para la agregación patológica de proteínas, de hecho, las inclusiones de TDP43 o FUS promueven la formación de los gránulos de estrés además de colocalizar con ellos (96, 119-121).

Los mecanismos epigenéticos, tales como la regulación de los micro-ARN, mantienen la identidad de los tipos celulares y tejidos, y podrían estar involucrados en el inicio y progresión de diversas enfermedades neurodegenerativas. En tejidos de médula espinal de pacientes de ELA se han observado unos niveles reducidos de micro-ARNs. Esto se relaciona con el deterioro de las vías y genes asociados a procesos como la biogénesis, neuroinflamación y apoptosis (96).

Alteración de la homeostasis proteica

Los agregados de proteínas son una de las características neuropatológicas principales de la ELA. La presencia de estos agregados en el citoplasma sugiere que existe un desequilibrio entre la síntesis de proteínas y las vías de degradación (96).

La proteostasis es un concepto que integra todas las vías biológicas que controlan la biogénesis, plegamiento, tráfico y degradación de proteínas presentes dentro y fuera de las células. En la ELA varios de estos procesos se encuentran afectados (122, 123). Entre ellos se encuentran la autofagia, la degradación a través del proteasoma y el estrés del retículo endoplasmático (96).

La autofagia es un proceso de autodegradación intracelular cuya función es retirar las proteínas mal plegadas o agregadas, así como las organelas dañadas. La actividad autofágica basal es un proceso esencial para el mantenimiento de la proteostasis y viabilidad de las neuronas debido a que, si los genes relacionados con la autofagia no están presentes en el SNC, se produce una neurodegeneración espontánea con acumulación de inclusiones positivas para ubiquitina, lo que acaba desencadenando una muerte neuronal, daño motor y muerte (32, 122).

Existen 3 subtipos de autofagia: macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas. La macroautofagia es la vía más común de autofagia, en ella se forman los autofagosomas, estructuras de doble membrana que envuelve los sustratos para su transporte y entrega a los lisosomas. La microautofagia está mediada por la envoltura directa por el lisosoma de los productos citoplasmáticos a degradar. La autofagia mediada por chaperonas provoca la degradación de proteínas citosólicas solubles mediante su traslocación directa al lisosoma, entre estas chaperonas podemos encontrar las proteínas de shock térmico (HSP) (122, 124).

Clasificación de los tipos de ELA

Los casos de ELA pueden clasificarse de diversas formas, dependiendo de la herencia genética, donde encontramos ELA esporádica o ELA familiar, del lugar de inicio, así como del tipo de motoneurona que se afecta en primer lugar, donde podemos clasificarlas en ELA bulbar, ELA espinal, Esclerosis Lateral Primaria (ELP) o Atrofia Muscular Progresiva (AMP). Por último, existen casos más concretos que presentan su propio grupo como puede ser la ELA juvenil o la ELA de la provincia de Guam.

ELA familiar

El 10% de los casos de ELA son familiares (ELA-F). La edad de inicio suele ser algo inferior a la media. Generalmente son casos hereditarios y asociados a mutaciones genéticas de herencia dominante (1, 4, 5, 125). Los casos de herencia recesiva son poco comunes (28).

Desde los años 90 el descubrimiento de genes asociados a esta enfermedad ha sido exponencial (FIGURA 7). Se conocen unas 120 variantes genéticas asociadas al riesgo de padecer esta enfermedad (24). Los principales genes asociados a esta enfermedad son la *copper-zinc superoxide dismutase 1 (SOD1)*, *TARDBP*, *Fused in Sarcoma (FUS)* y una expansión repetitiva de G₄C₂ en el marco de lectura 72 del cromosoma 9 (*C9ORF72*). En conjunto, las mutaciones en estos genes representan hasta un 80% de los casos de ELA-F (126).

Los genes asociados con esta enfermedad pueden clasificarse en 3 grupos diferentes: aquellos que alteran la proteostasis y el control de calidad de las proteínas, los que afectan a la estabilidad, función o metabolismo del ARN y por último aquellos que interfieren en la dinámica citoesquelética de los axones de las motoneuronas (3).

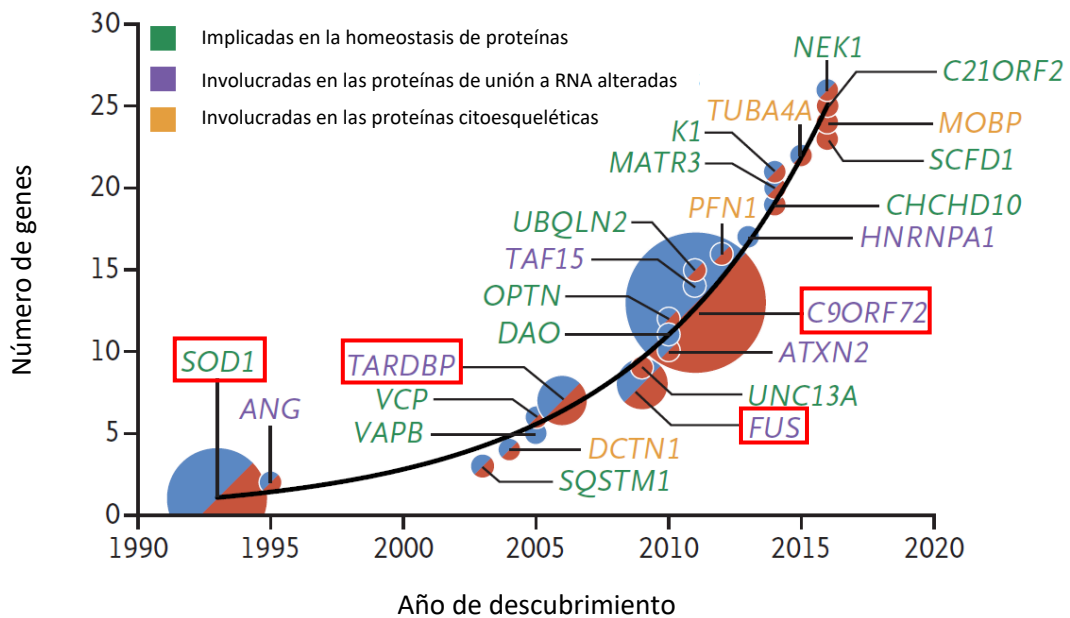


Figura 7: Genes asociados a la ELA y año de descubrimiento. Se señalan en rojo los principales genes causantes de la ELA. Modificado de (24).

SOD1

El primer gen que fue asociado a la ELA fue el gen *SOD1*. La primera mutación asociada a esta enfermedad fue descubierta por Rosen y colaboradores en 1993 (127). El 15-20% de los casos de ELA-F están asociados a mutaciones de este gen (105, 128). Se han descubierto más de 180 mutaciones en este gen que se relacionan con la ELA (129, 130). La mayoría de estas, son mutaciones puntuales sin sentido. Aproximadamente el 48% de los aminoácidos de este gen presentan mutaciones asociadas a la ELA y se localizan a lo largo de todos los exones del gen (105).

SOD1 es un gen altamente conservado a lo largo de la evolución y se expresa ubicuamente por todo el SNC. Este gen codifica para una enzima homodimérica de 32KDa, localizada en el cromosoma 21 (131). Su localización es citosólica y mitocondrial y su función principal es catalizar la dismutación del anión superóxido a oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno, protegiendo así a las células de la toxicidad provocada por las especies reactivas de oxígeno (105, 127, 129). Esta enzima además, presenta otras funciones, como la activación de la transcripción genética tras un aumento del estrés oxidativo o la regulación del metabolismo del ARN, además, ha mostrado tener un papel en la tumorigénesis (131).

Existen diversos mecanismos a través de los cuales las mutaciones de *SOD1* lideran la patogénesis de la enfermedad, entre ellos podemos encontrar el mal plegamiento de proteínas, deficiencias en el proteasoma y estrés oxidativo, entre otros (132, 133). También se producen deficiencias en la actividad mitocondrial, así como en el citoesqueleto (132).

Las principales mutaciones patológicas asociadas con la ELA familiar son G93A, A4V, H46R y D90A. De ellas, G93A es la más estudiada, mientras que D90A es la mutación más prevalente en Europa, sin embargo, en Estados Unidos la más prevalente es la A4V (132). La mutación G93A, a pesar de ser poco común, está relativamente bien estudiada, debido a que fue la primera mutación de este gen que permitió la generación de un modelo animal genético. Esta mutación causa un efecto moderado en la actividad enzimática, y provoca síntomas motores (132). Por otro lado, la mutación D90A, mayoritariamente recesiva, causa dos fases en la enfermedad. Una primera fase en la que los pacientes presentan deficiencias sensoriales en la parte baja de la espalda y cadera, además de dolor en las articulaciones, que posteriormente se resuelven progresando a una segunda fase, donde la debilidad muscular comienza en una de las extremidades y progresa de forma proximal y lenta (134). Por último, la mutación A4V puede causar ELA a cualquier edad. Los síntomas se presentan de forma repentina y la enfermedad progresa rápidamente provocando el fallecimiento aproximadamente 1,4 años después del inicio. La muerte de las motoneuronas inferiores lidera la clínica de estos pacientes (132).

En un primer momento, se consideró que SOD1 podría provocar la enfermedad debido a una pérdida en su función enzimática, sin embargo, algunos estudios han demostrado que una baja actividad enzimática de SOD1 no está relacionada con la severidad o causalidad de la enfermedad, pero sí puede modificar algunos aspectos de la patogénesis (128, 129, 135). Además, diversas mutaciones patológicas para la ELA no afectan a la actividad dismutasa de SOD1 (128). Un aspecto importante a tener en cuenta es que los portadores de mutaciones heterocigotas que afectan a la pérdida de función de la proteína, no se ven afectados por la enfermedad, sin embargo, cuando la mutación es homocigota se desarrollan deficiencias en el sistema motor. En los últimos años, los estudios indican que la patología podría ser causada por una ganancia de función de SOD1 (129, 134), independiente de la actividad fisiológica de esta enzima (134).

Mutaciones, como la G93A, A4V o L38V, entre otras mutaciones características de ELA-F, han demostrado que generan inclusiones citoplasmáticas, lo que perjudica la traslocación de SOD1 al núcleo, proceso regulado por las ROS, y en consecuencia se compromete la respuesta antioxidante, así como la supervivencia celular (131, 132) de las motoneuronas, debido a que este tipo celular es particularmente vulnerable al estrés oxidativo (132).

Uno de los principales factores que intervienen en la patogénesis de la ELA es la desregulación del ARN (131, 136). SOD1, a pesar de no contener un dominio específico de unión a ARN, está implicado en la regulación del metabolismo de este. Principalmente, cuando *SOD1* está mutado, aumenta su capacidad de unión a ARNm del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) o de los neurofilamentos de cadena ligera (NFL) y esto puede afectar de forma negativa a su expresión, estabilización y función. Además, esta unión a proteínas provoca que se produzcan deslocalizaciones de SOD1, que causan la exposición de polipéptidos que aumentan la capacidad de unión a ácidos nucleicos (131, 136, 137).

Los pacientes de ELA que presentan mutaciones en esta enzima, de forma general, presentan una mayor duración de la enfermedad que los pacientes que presentan la patología esporádica (138).

Diversos estudios neuropatológicos muestran que existe una falta de inmunorreactividad para TDP43, a pesar de mostrar inclusiones ubiquitinadas. Así mismo, se encuentra un deterioro menor en la corteza motora que en casos esporádicos, además de una relativa preservación del sistema motor del cerebro, así como, cambios neurometabólicos en la región cervical de la médula espinal (138). Los resultados de estudios con resonancia magnética han demostrado que las médulas espinales de pacientes de ELA-SOD1 podrían ser más vulnerables a las acumulaciones de alteraciones patológicas a lo largo del curso de la enfermedad (138).

TDP43

Numerosas mutaciones asociadas con el gen de TDP43 han sido relacionadas con la ELA y aproximadamente corresponden al 3% de los casos de ELA-F (139), además, a pesar de que pocos casos de ELA esporádica están causados por las mutaciones de este gen, la patología provocada por la proteína se observa en el 90% de los pacientes de esta enfermedad (140).

TDP43 es una proteína ubicua codificada por el gen *TARDBP*, la cual pertenece a la familia de ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas. Presenta un tamaño de 43kDa y está localizada en el cromosoma 1, presenta una región N-terminal, una señal de localización nuclear (NSL), además de una región señalizadora de exportación nuclear (NES), dos dominios de reconocimiento del ARN, y por último una región C-terminal.

Fisiológicamente, esta proteína está mayoritariamente en el núcleo, participando en la regulación del ARN, así como en el *splicing* alternativo o la estabilización del ARN mensajero (140-142). Sin embargo, existen procesos mediados por el transporte activo y pasivo, a través de los cuales TDP43 se desplaza entre el núcleo y el citoplasma para realizar diversas funciones celulares. Los niveles y la localización se regulan mediante un mecanismo de *feedback* negativo regulado por importinas y exportinas que reconocen los dominios NSL y NSE (35, 139, 140). Otra de sus funciones es la de formar los gránulos de estrés, los cuales protegen a las células de procesos como el estrés oxidativo (35), aumentándose en este caso el transporte de TDP43 al citoplasma, pero cuando las situaciones de estrés desaparecen, los gránulos se desensamblan y el TDP43 liberado se transloca de nuevo al núcleo (140).

Dentro de las funciones fisiológicas de TDP43 se encuentra la orientación del crecimiento de las dendritas y axones durante el desarrollo embrionario; además, en las motoneuronas regula la morfología y desarrollo de las espinas dendríticas, así como la plasticidad neuronal (141).

Actualmente no se conoce aún el mecanismo por el cual TDP43 causa la neurodegeneración (35, 142). Las características histopatológicas de las proteinopatías de TDP43, en concreto la localización citosólica y el aumento del aclaramiento nuclear, indican que podrían existir dos mecanismos por los cuales se desencadena la patología. Estos mecanismos son una pérdida de función nuclear y una ganancia de función citosólica (35).

La mayoría de las mutaciones suceden en la región C terminal, lo cual aumenta la posibilidad de agregación, liderando un aumento de la citotoxicidad de TDP43, lo que correlaciona con el mecanismo de ganancia toxica de función. Entre ellas encontramos las mutaciones A382T y M337V que provocan la agregación citoplasmática liderando el estrés oxidativo, el estrés de retículo endoplasmático e induciendo la apoptosis neuronal. Sin embargo, no todas las mutaciones de TDP43 patológicas se localizan en este dominio, por ejemplo, la mutación D169G, localizada en uno de los dominios de reconocimiento del ARN, causa cambios estructurales en la proteína, aumentado la susceptibilidad de esta a la rotura proteolítica causada por caspasa 3. En este caso se produce una proteína de menor tamaño que es patogénica y también genera agregados (35, 142).

Por otro lado, la reducción de TDP43 nuclear provoca una desregulación del metabolismo del ARN, lo que conlleva una reducción en la producción proteica lo que lideraría el mecanismo de pérdida de función (35). Esta pérdida de función nuclear se ha visto que correlaciona de forma más férrea con la disfunción neuronal que la propia agregación citoplasmática (143).

En los cerebros de pacientes con ELA se han encontrado evidencias de daño patológico en el poro nuclear y unos niveles reducidos de las importinas, lo que conlleva el deterioro del transporte nucleocitoplasmático (139).

De igual forma, en los pacientes de ELA se han encontrado inclusiones de TDP43 no solo en la médula espinal, los núcleos motores o el tronco cerebral, sino que también están presentes en otras regiones como el hipocampo (144). Diversos estudios neuropatológicos de pacientes de ELA han demostrado que la patología se extiende a regiones conectadas neurológicamente entre sí, en vez de a regiones próximas espacialmente (143), pudiendo dividirse la patología asociada a TDP43 en 4 estadios (140).

- Estadio 1: las inclusiones de TDP43 ocurren principalmente en las proyecciones de las neuronas de la corteza motora agranular, así como en las neuronas somatosensoriales del tronco cerebral y de la médula.
- Estadio 2: la agregación proteica se propaga a otras regiones cerebrales como el córtex prefrontal, la formación reticular, los núcleos precerebelares del tronco del encéfalo y la porción parvo celular del núcleo rojo.

- Estadio 3: la patología de TDP43 se desarrolla en el córtex prefrontal, en el estriado y en los ganglios basales.
- Estadio 4: la patología progresa a regiones como las anteromediales del lóbulo temporal, así como la corteza entorrinal, el hipocampo y la fascia dentada.

Las inclusiones de TDP43 han sido observadas, como ya se ha comentado anteriormente, en una amplia mayoría de los pacientes de ELA independientemente de si presentaban demencia asociada o no, a excepción de aquellos que presentan la patología debido a mutaciones en *SOD1*, los cuales no presentan inclusiones de TDP43. Las inclusiones ven aumentado su número conforme evoluciona la patología y se desarrollan los síntomas cognitivos (35). Tanto en la corteza motora como en la médula espinal, en el plasma y el LCR de pacientes de ELA se muestra un aumento de los niveles totales de TDP43, lo que correlaciona con la severidad y duración de la patología (139).

Una de las características diferenciales entre la ELA asociada a DFT y la que no se asocia a esta patología, la encontramos en el grado de patología asociada a TDP43. La presencia de patología en regiones extramotoras como la corteza orbitofrontal, el giro frontal inferior o el cíngulo anterior ventral, se asocian con el deterioro cognitivo encontrado en pacientes de ELA (35).

FUS

Fused in Sarcoma (FUS) es una proteína ubicua de unión a ADN y ARN formada por 526 aminoácidos. El 5% de los casos de ELA-F presentan mutaciones en el gen que codifica esta proteína (145, 146). Los primeros casos de ELA asociados a mutaciones en este gen fueron descubiertos en 2009 (147).

El gen que codifica esta proteína se identificó por primera vez en un oncogén del cromosoma 16 de un liposarcoma humano. Este gen se conforma de un dominio N-terminal de activación transcripcional (QGSY), 3 regiones de repetición de arginina-glicina-glicina (RGG), un motivo de dedo de zinc (ZnF), una señal de exportación nuclear (NES) y una región C-terminal con una señal de localización nuclear (NSL). Además, presenta 2 dominios *prion-like* (142, 145).

FUS está involucrada en diversos procesos como son la transcripción y regulación génica, reparación del ADN, transporte del ARN, traducción y procesamiento de microARN y mantenimiento de la estabilidad genómica (145). Es una proteína importante durante el desarrollo del SNC, de hecho, si esta proteína se pierde de forma homocigota se produce la muerte durante el estado embrionario (148). Al igual que sucedía con TDP43, esta proteína se transporta entre el núcleo y el citoplasma gracias a las regiones NSL y NES (142).

En condiciones fisiológicas, FUS está localizada tanto en el núcleo como en el citoplasma, sin embargo, en las neuronas los niveles nucleares son más altos que los citoplasmáticos y en la glía son exclusivamente nucleares (147, 149). FUS puede unirse tanto a ARN, ADN de cadena simple o ADN de cadena doble. La región más importante con función de unión es la secuencia GUGGU en la región 5', sin embargo, cuando FUS muta, se une a través de la región 3' y las regiones intrónicas (145).

Una de las funciones de FUS es participar en diferentes niveles del metabolismo del ARN. Es capaz de modificar los niveles de transcripción, uniéndose a los motivos de ADN de cadena simple y acumulándose en las vecindades de los sitios de inicio de la transcripción. Además, se une a la ARN polimerasa II alterando los niveles de fosforilación. Por otro lado, estudios de fluorescencia han demostrado que se localiza en la cromatina activa. También participa modulando el *splicing* del ARN y en el transporte del ARNm entre el núcleo y el citoplasma (145).

FUS participa en la transferencia del ARNm entre las dendritas neuronales y las espinas dendríticas, lo cual lo hace esencial para la maduración de las células neuronales, plasticidad e integridad dendrítica (145, 149).

Otro de los procesos en los que participa la proteína FUS es la reparación de ADN, participando en procesos como la recombinación homóloga. En modelos animales se ha visto que una deficiencia de FUS provoca una hipersensibilidad a la radiación ionizante aumentándose la inestabilidad genómica a nivel de los cromosomas, además de defectos en el desarrollo de células B y espermatogénesis, donde los errores en el ADN ocurren frecuentemente (150).

Las mutaciones que causan la ELA-F se localizan principalmente en la secuencia NLS y se asocian con un curso de la enfermedad más severo, además de correlacionar positivamente con el inicio de la enfermedad. Así mismo, se ha encontrado que los pacientes de ELA con mutaciones de *FUS* presentan más frecuentemente un inicio bulbar, lo que correlaciona con una mayor severidad (151). Las principales mutaciones asociadas a esta enfermedad son R521C, R521H y R521G (148).

Las mutaciones de este gen correlacionan con un inicio más temprano de la patología, curiosamente, el caso más temprano de inicio de esta patología se ha encontrado en un paciente de 11 años (ELA Juvenil (JELA)) con la mutación P525L en este gen (151). Esta mutación aumenta el riesgo de progresión rápida (152). Los pacientes de ELA que portan esta mutación suelen presentar, a parte de los síntomas comunes de esta patología, otro tipo de síntomas como son retraso en el desarrollo, oftalmoplejía, deterioros cognitivos y temblores (150).

Por otro lado, la mutación Y526C se ha asociado con un inicio juvenil, progresión rápida y signos clínicos atípicos (151). Las mutaciones R244C, R514S y R521C provocan que el proceso de reparación del ADN sea deficiente. BDNF (Factor neurotrófico derivado del cerebro) presenta un papel crítico promoviendo el crecimiento dendrítico y, en la formación de sinapsis, las neuronas que presentan la mutación R521C muestran una disminución del crecimiento dendrítico similar al que sucede cuando existen deficiencias en el gen *BDNF*. Esto sugiere que las deficiencias en la reparación del ADN, que está mediada por *FUS*, ocurre en los genes importantes para el desarrollo neuronal y estos errores podrían promover la neurodegeneración (153).

En condiciones patológicas, esta proteína transloca al citoplasma, lo que sugeriría una pérdida de función nuclear, además de una ganancia de función tóxica citoplasmática (149). Una de las principales características de la ELA-FUS son las inclusiones positivas para esta proteína, pero negativas para TDP43 (38, 147), lo que indicaría que los mecanismos que lideran la patología de cada gen son independientes (148).

Histopatológicamente los pacientes de ELA-FUS presentan las características clásicas de la ELA, como son la pérdida de motoneuronas y la degeneración de los tractos corticoespinales, sin embargo, no se encuentran cuerpos de Bunina. También se encuentran inclusiones en células gliales, principalmente en oligodendrocitos y en las motoneuronas. Estas inclusiones son heterogéneas en cuanto a morfología, abundancia y distribución dependiendo, de la mutación presente (147).

C9ORF72

En 2011, las expansiones de la repetición del hexanucleótido (HRE) GGGGCC del gen *C9ORF72* fueron asociadas a la ELA (154-156). Sin embargo, son la causa más común de ELA-F (157), estando relacionadas con este gen un 40% de los casos de ELA-F en poblaciones europeas (158).

Este gen se localiza en el brazo corto del cromosoma 9 y contiene 12 exones, y es capaz de formar 3 variantes dependiendo del inicio de la transcripción. Las HRE se localizan en la región no codificante, concretamente en el intrón 1 de las variantes 1 (222 aminoácidos) y 3 (481 aminoácidos), y en la región promotora de la variante 2 (481 aminoácidos). A pesar de encontrarse en la región no codificante, estas HRE son capaces de mantenerse en el ARNm y traducirse como si fuesen codificantes (159).

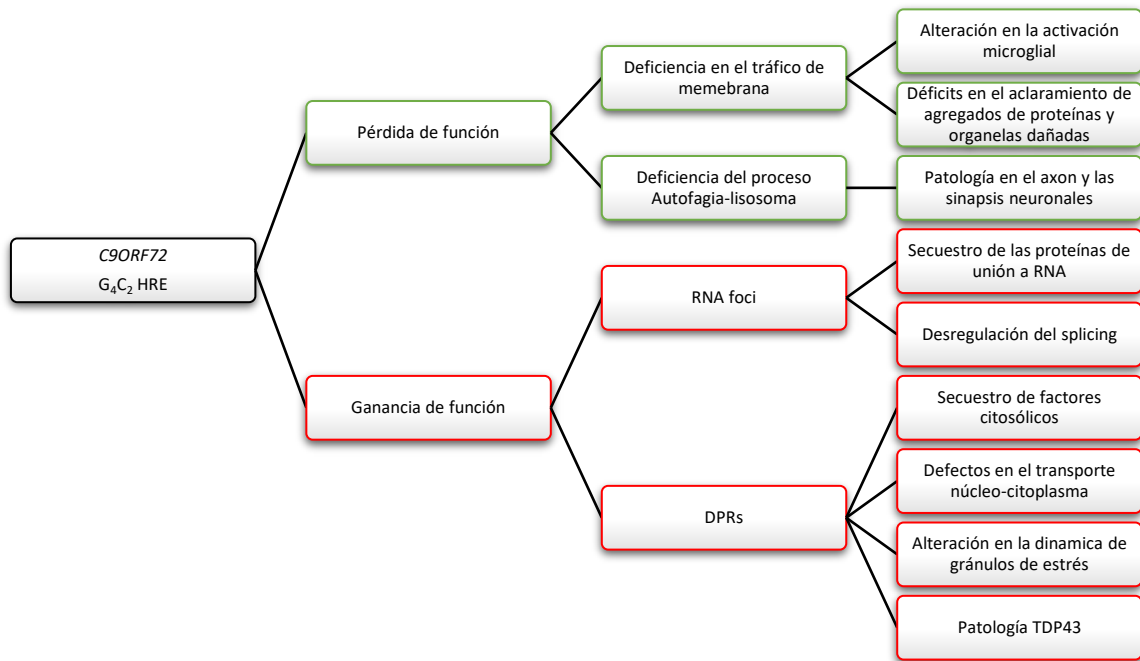
En el SNC predomina la variante 2. El 95% de las personas sanas presentan menos de 11 repeticiones de la expansión GGGGCC, el límite de los fenotipos normales está en 30 repeticiones. Los pacientes de ELA presentan mayoritariamente entre 400 y 4400 repeticiones, aunque existen excepciones en las que la patología se presenta con 24-28 repeticiones (159).

Este gen está altamente conservado en los primates a través de sus diferentes especies, esto sugiere que la proteína que codifica este gen tendría funciones biológicas fundamentales. En humanos, los transcritos de *C9ORF72* son detectables en la mayoría de los tejidos, principalmente en el cerebro y la médula espinal, aunque los niveles más altos se encuentran en las células mieloides, como por ejemplo los monocitos CD14+, eosinófilos y neutrófilos. Principalmente se localizan en las membranas nucleares (160).

Esta proteína interactúa con las importinas, una de las principales proteínas participantes del transporte nucleocitoplasmático. Además, participa en la regulación de la formación y degradación de los gránulos de estrés, jugando un papel crucial debido a que, si C9ORF72 no se encuentra presente, estos gránulos no se pueden formar provocando la reducción de los niveles de proteínas asociadas a ellos. En cuanto a la degradación de los gránulos de estrés, C9ORF72 se asocia con p62 para que los gránulos de estrés comiencen su degradación mediante autofagia (160).

Por otro lado, esta proteína también participa en el crecimiento de los axones. Se ha demostrado que una sobreexpresión de C9ORF72 genera unos axones más largos y aumenta el tamaño del cono de crecimiento. Si, por el contrario, existen unos niveles menores de esta proteína, los axones son más cortos y los conos menores. También es fundamental para que la actividad neuronal sea normal y para una buena función sináptica. Estos procesos dependen de la energía proporcionada por los complejos de fosforilación oxidativa mitocondrial y, C9ORF72 regula la actividad de estos complejos estabilizándolos (160).

Las HRE se transcriben y traducen en ambos sentidos del marco de lectura siguiendo una traducción no AUG, generando dipéptidos que agregan (DPR). Los principales son poli-GA, -GP, -GR, -PA y -PR (161, 162).



Esquema 1: Mecanismos afectados en ELA-F-C9ORF72. Modificado de (151).

Las HRE provocan la enfermedad debido a dos mecanismos que no son excluyentes entre sí. El primero de ellos es una ganancia tóxica de función, mientras que el otro es una pérdida de función de la proteína (FIGURA 8) (157, 158).

Los mecanismos de ganancia tóxica de función incluyen las repeticiones de ARN y los DPR. Las HRE, se transcriben bidireccionalmente, lo que genera repeticiones de ARN que forman ARN *foci*. Estos ARN *foci* se acumulan en el núcleo provocando el secuestro de las proteínas de unión al ARN, lo que interrumpe procesos como el *splicing*, el transporte y la traducción del ARN (157, 163, 164).

Los ARN *foci* en sentido positivo, se localizan en numerosas regiones cerebrales como las regiones corticales, las células granulares del giro dentado del hipocampo o el cerebelo. Por su parte, los ARN *foci* antisentido se localizan en las células de Purkinje cerebelares y en las neuronas de la médula espinal (165).

Por otro lado, en algunos pacientes se han encontrado DPR agregados en las inclusiones citoplasmáticas del cerebro y médula espinal y de forma ocasional en inclusiones nucleares, así como en el músculo esquelético del 40% de los pacientes (157, 161). Estos DPR provocan su toxicidad mediante el secuestro de proteínas, o interfiriendo en procesos como el transporte nucleocitoplasmático (157); que los procesos metabólicos celulares se interrumpan o estén deteriorados contribuye a la formación de inclusiones positivas para TDP43.

Los DPR ricos en arginina como pueden ser el poli-PR o poli-GR, son altamente neurotóxicos (162). Estos péptidos, presentan una alta afinidad por el ARN o el ADN y esto lidera un revestimiento generalizado de los ácidos nucleicos en las células, provocando un desplazamiento de los factores de unión al ADN y ARN de la cromatina, lo que implica que los procesos que necesitan de estos ácidos nucleicos como sustratos se vean afectados, como por ejemplo, el ensamblaje de las subunidades de los ribosomas, el *splicing*, la biosíntesis del ARN o su exportación y la reacción en cadena de la polimerasa dependiente de ADN. Todos estos procesos alterados se ven afectados en la patogénesis de la ELA (166).

Las inclusiones de DPR se distribuyen a lo largo de todas las regiones cerebrales, siendo más abundantes en la corteza cerebral, hipocampo, amígdala, tálamo medial y en las células granulares del cerebelo, sin embargo, son menos frecuentes en los ganglios basales, los núcleos del tronco cerebral y la médula espinal. Es importante destacar que estas inclusiones de DPR no se han encontrado en astrocitos, microglía y oligodendrocitos, pero sí que están presentes en las células ependimales del canal central de la médula espinal y en las células subependimales del ventrículo lateral (167).

Por otro lado, existen diversas evidencias que indican que una pérdida de función de C9ORF72 es otro de los mecanismos que desencadenarían la patología. En los cerebros y médulas espinales de pacientes de ELA, se han encontrado niveles bajos de expresión de C9ORF72. Este descenso es debido a que las transcripciones se detienen de forma temprana, y por las hipermetilaciones en las regiones promotoras (157).

Esta deficiencia de C9ORF72, influye en diversos procesos celulares como es el tráfico endolisosomal, la vía de la autofagia y la inflamación mediada por la microglía. Así mismo, provoca defectos en los axones y sinapsis. Además, contribuye a agravar la patología provocada por TDP43 y favorece que otros tipos celulares, a parte de las neuronas, sean más sensibles a la excitotoxicidad lo que podría contribuir a la muerte neuronal (157).

Unos niveles reducidos, o la ausencia de C9ORF72, provocan la supresión del proceso de la autofagia y contribuye a procesos como la activación de las células gliales, la acumulación de los DPR, al aumento de déficits cognitivos y a la degeneración de neuronas hipocampales. Todo esto indica que una deficiencia de C9ORF72 no solo provoca la patología por sí misma, sino que exacerba los daños provocados por los mecanismos de ganancia tóxica de función (163).

ELA esporádica

La mayoría de los casos de ELA, aproximadamente el 90% de ellos, son casos esporádicos. A pesar de que las investigaciones sobre esta patología han aumentado considerablemente a lo largo de los años, la etiología de ELA-E sigue siendo desconocida. Se considera que existen interacciones complejas entre la susceptibilidad genética y el medio ambiente (168).

A pesar de no conocerse la etiología, los estudios de GWAS han determinado ciertos *loci* que contribuyen al riesgo de padecer esta patología. El principal se relaciona con C9ORF72, aunque también se han asociado la UNC13A, proteína presintomática que regula la liberación de neurotransmisores, y la ELP3 involucrada en el procesamiento del ARN (168).

A parte de la susceptibilidad genética, existen diversos factores ambientales que podrían tener relación con la patología. El mayor factor de riesgo es el género, los hombres presentan 1,5 veces más riesgo de padecer esta patología que las mujeres, esto podría ser debido a la testosterona ya que esta comienza a afectar desde el útero, y la testosterona fetal se ha relacionado con la ELA (169). Por otro lado, algunos estudios epidemiológicos han sugerido que la exposición a pesticidas organofosforados se asociarían con ELA-E, ya que algunos de ellos se relacionan con el estrés oxidativo, uno de los principales mecanismos que lideran la degeneración de las motoneuronas. Otro posible factor ambiental es la exposición a metales como el plomo, ya que se han encontrado altos niveles de ciertos metales en la sangre, huesos, LCR, orina y médulas espinales de los pacientes de ELA-E, sin embargo, el papel que juegan estos metales en la patogénesis todavía es desconocido. Sumado a estos factores, también ha sido descrito que las infecciones virales previas al inicio de los síntomas, junto con la susceptibilidad genética individual, podrían aumentar el riesgo de desarrollar esta patología (170). Otro factor de riesgo son los despliegues militares, este es un factor bastante controvertido, ya que este aumento del riesgo de padecer la enfermedad se ha visto limitado a los 10 años posteriores a la Guerra del Golfo y solo ocurría en el personal que había sido desplegado sugiriendo la exposición a algún agente neurotóxico (171, 172). Otro factor con el que se ha visto relación han sido los traumatismos craneo encefálicos o contusiones que conllevan pérdida de consciencia, y este riesgo aumenta si esto ocurre después de los 30 años (173).

Macroscópicamente, las astas ventrales de la médula espinal de los pacientes de ELA-E se encuentran encogidas y aparentemente grises en comparación con las astas dorsales, además, los tractos corticoespinales o incluso la médula completa pueden parecer atróficas. Por su parte, los cerebros aparentemente son normales, pero se puede apreciar atrofia en el giro precentral, así como en los lóbulos frontal y temporal, sobre todo si existe deterioro cognitivo (174).

Neuropatológicamente, se encuentran cambios degenerativos en las regiones motoras, encontrándose numerosas motoneuronas atrofiadas, esto desemboca en una denervación crónica y atrofia neurogénica en los músculos estriados de las extremidades y músculos respiratorios. En las astas anteriores de la médula espinal, además de la marcada atrofia, se encuentra una astrogliosis reactiva. Además, las motoneuronas que no se encuentran atróficas, muestran signos de regresión como son la tendencia a arrugarse, presencia de depósitos de lipofuscinas e inclusiones como los cuerpos de Bunina, inclusiones positivas para ubiquitina o TDP43 en el citoplasma y cromatolisis en el núcleo. Por otro lado, también se encuentran defectos en los oligodendrocitos que contribuyen a la degeneración motoneuronal (174).

La localización de la atrofia es un aspecto importante, ya que dependiendo del tipo de inicio en el que se presente, la atrofia se localiza en diferentes tejidos. En las formas bulbares la atrofia se observa principalmente en la lengua, el diafragma, y los músculos intercostales (174). Las formas bulbares representan el 25% de los casos de ELA y se caracterizan por un deterioro de las motoneuronas superiores e inferiores de los nervios craneales manifestándose con dificultades del habla y disfagia, seguida de una afectación de las extremidades en las fases finales de la enfermedad (26). Por su parte en las formas espinales la atrofia ocurre principalmente en los músculos de las extremidades (174). Las formas espinales representan el 70% de los casos de ELA, y generalmente comienzan con un deterioro de las motoneuronas inferiores de forma proximal y simétrica que progresa de forma distal por toda la extremidad. Los pacientes con este tipo de inicio presentan una progresión más lenta a otros segmentos del cuerpo, así como a los músculos respiratorios. (26).

De todos los casos de ELA-E, solo el 10% presentan mutaciones en genes que presentan relación con la enfermedad. Las mutaciones en *C9ORF72* son las más abundantes en los casos de ELA-E, mientras que las mutaciones en *SOD1* representan el 2-3% de los casos (174). También se han encontrado mutaciones asociadas a ELA-E en el gen *TARDBP* en aproximadamente un 2% de los casos (175, 176), así como mutaciones en *FUS* (177).

A diferencia de los pacientes de ELA-F asociadas a mutaciones en *C9ORF72*, en la patología esporádica, los casos asociados a este gen que presentan DPRs tienen inclusiones positivas para p62, pero en este caso son negativas para TDP43 en las neuronas del cerebelo y del hipocampo. Además, los fibroblastos derivados de pacientes de ELA-F presentan inclusiones TDP43 más pequeñas y en menor número que los casos esporádicos (157).

Otro rasgo característico de ELA-E frente a ELA-F relacionado con el gen *SOD1*, es que los pacientes de ELA-E presentan inclusiones gliales y neuronales que son inmunorreactivas para ubiquitina y TDP43, sin embargo, los pacientes de ELA-F-*SOD1* presentan inclusiones positivas para ubiquitina pero negativas para TDP43, lo que implicaría que los procesos que subyacen la degeneración motoneuronal en ELA-E son diferentes a los casos de ELA-F asociados a *SOD1* (178). Esta diferencia con los casos de ELA-F-*SOD1* es exclusiva de este tipo de casos familiares, ya que el resto de pacientes de ELA-F con otras mutaciones sí que presentan patología asociada a TDP43 (179).

Otros Tipos de ELA

La ELA juvenil (JELA) es un tipo de ELA en el cual el inicio de los síntomas ocurre antes de los 25 años. Suele ser un tipo raro de esta patología y su patogénesis no está del todo clara. El primer caso de esta patología se reportó en Japón en 1978 en un paciente de 17 años (6). La prevalencia de esta patología es de 1:1.000.000 (180).

Los casos de JELA, se han relacionado al igual que ELA-F y ELA-E con genes como *FUS*, *TDP43*, *C9ORF72* y *SOD1*, sin embargo, los casos asociados a estos genes son una pequeña minoría, ya que la mayoría de ellos se asocian a genes como la *ALS2 (alsin)*, *SEXT (senataxin)* (*ALS4*) y genes asociados al cromosoma 15 (*ALS5*) (6, 180).

Las formas genéticas de JELA se clasifican en 3 tipos, JELA2, JELA4 y JELA5. JELA2 presenta una herencia recesiva y se caracteriza por una progresión lenta de la patología. Se han identificado 9 mutaciones asociadas al gen *ALS2* que lideran la patología debido a una pérdida de función de la alsina. Por su parte JELA4 presenta una herencia dominante la cual presenta una progresión lenta, debilidad muscular severa y signos piramidales en ausencia de signos bulbares o sensoriales. Estos casos se asocian a mutaciones en el gen *setx*. Por último, JELA5 con una herencia recesiva, presenta una progresión lenta de la atrofia de las motoneuronas inferiores, así como la debilidad de pies y manos donde suele iniciarse (181).

Otra variante de ELA es la Esclerosis Lateral Primaria (ELP), que es una forma rara y no hereditaria que afecta exclusivamente a las motoneuronas superiores, con un origen gradual y asimétrico. Los principales síntomas son la espasticidad, rigidez, calambres e hiperreflexia. A diferencia de las formas clásicas de ELA, este tipo raramente es fatal y la esperanza de vida es normal (1, 22, 24, 182, 183).

Por su parte la Atrofia Muscular Progresiva (AMP) comienza con debilidad muscular, atrofia y fasciculaciones. Al igual que sucedía con la ELP, la AMP solo afecta a un tipo de motoneuronas, en este caso a las motoneuronas inferiores. También es un tipo raro de enfermedad y suele presentarse con un inicio más temprano y suele terminar degenerando a ELA (1, 24, 182, 183).

Por último, tenemos la parálisis bulbar progresiva (PBP) que afecta exclusivamente al tronco cerebral, afectando principalmente a los nervios craneales glossofaríngeo, vago e hipogloso. Los principales síntomas son dificultad para tragar, pérdida del habla, debilidad y atrofia facial y de los músculos de la lengua. Presenta un inicio tardío y una progresión lenta. Suele ser fatal debido principalmente a complicaciones por neumonías (1, 24, 182, 183).

Diagnóstico de la ELA

La variabilidad clínica con la que cursa esta patología, así como la falta de un biomarcador diagnóstico concreto, provoca que el proceso de diagnóstico sea complicado. Actualmente se utilizan los criterios de El Escorial revisados, que fueron fruto de un trabajo del comité de la Federación Mundial de Investigación Neurológica en Enfermedades de Motoneuronas en 1998 (184).

Según estos criterios, el diagnóstico de la ELA se basa en (TABLA 2):

Presencia	Ausencia
Evidencia de degeneración de las motoneuronas inferiores determinada por un examen clínico, electrofisiológico o neuropatológico.	Evidencias patológicas o electrofisiológicas de otras enfermedades que pudieran explicar la degeneración de las motoneuronas tanto inferiores como superiores.
Evidencia de degeneración de las motoneuronas superiores determinada por un examen clínico.	Evidencias de neuroimagen que indiquen otros procesos patológicos y que explicarían los signos clínicos y electrofisiológicos encontrados.
Propagación progresiva de los síntomas o signos entre una región y/o a otras regiones, basada en la historia clínica o durante la exploración.	

Tabla 2: Criterios de diagnóstico de la ELA.

Teniendo en cuenta los criterios clínicos, la ELA se diagnosticará como:

- ELA clínicamente definitiva: se define gracias a signos clínicos de motoneuronas inferior y superior en al menos 3 regiones (bulbar, cervical, torácica o lumbar).
- ELA clínicamente probable: se define por la presencia de signos clínicos de motoneurona inferior o superior en 2 regiones, con signos de motoneurona superior en regiones rostrales de las de motoneurona inferior.

- ELA clínicamente probable con apoyo de pruebas complementarias: se define por signos clínicos de motoneurona superior en una región y criterios electrofisiológicos de motoneurona inferior en dos regiones.
- ELA clínicamente posible: signos clínicos de motoneurona inferior y superior en la misma región, signos de motoneurona superior en dos regiones, o signos de motoneurona superior e inferior cuando los de motoneurona inferior son rostrales a la superior.

Años más tarde y para aumentar la sensibilidad al detectar un caso definitivo de uno probable de ELA, se propusieron los criterios de Awaji (185, 186), los cuales dan un mayor valor diagnóstico a la electrofisiología. En estos criterios se confirmaron las utilidades del electromiograma (EMG) de aguja y los estudios de neuroconducción. Así mismo, se consideró que las evidencias electrofisiológicas de cambios neurogénicos crónicos debían ser considerados como equivalentes a la información clínica que indica la presencia de deterioro de los músculos. Además, las fasciculaciones se deben tomar como equivalentes de los potenciales fibrilatorios y ondas positivas, siendo un marcador de denervación incluso en músculos sanos.

Todo ello llevó a reinterpretar los criterios de El Escorial revisados, eliminando la categoría de ELA probable sustentada por pruebas de laboratorio.

El reflejo H como marcador de la patología

Una de las pruebas electrofisiológicas utilizadas para evaluar la excitabilidad de las motoneuronas, así como la fisiología básica de los reflejos de los segmentos espinales, además de su relación con ciertos signos clínicos de diversos síndromes de motoneurona superior, es el reflejo de Hoffmann o reflejo H (187).

Esta técnica se basa en estimular eléctricamente las fibras sensoriales en un nervio periférico y registrar el reflejo de respuesta en el músculo homónimo. Esta respuesta es el ya mencionado reflejo H (FIGURA 9) (51, 188, 189).

La respuesta obtenida tras la estimulación del nervio está formada por dos componentes, el primero que se obtiene es la onda M como respuesta a la activación directa de los axones motores que inervan el músculo. En segundo lugar, se obtiene el reflejo H como tal, este ocurre de forma posterior debido a que es el resultado de la activación monosináptica de las motoneuronas al recibir la activación de la fibra la propioceptiva. (FIGURA 9) (51, 190).

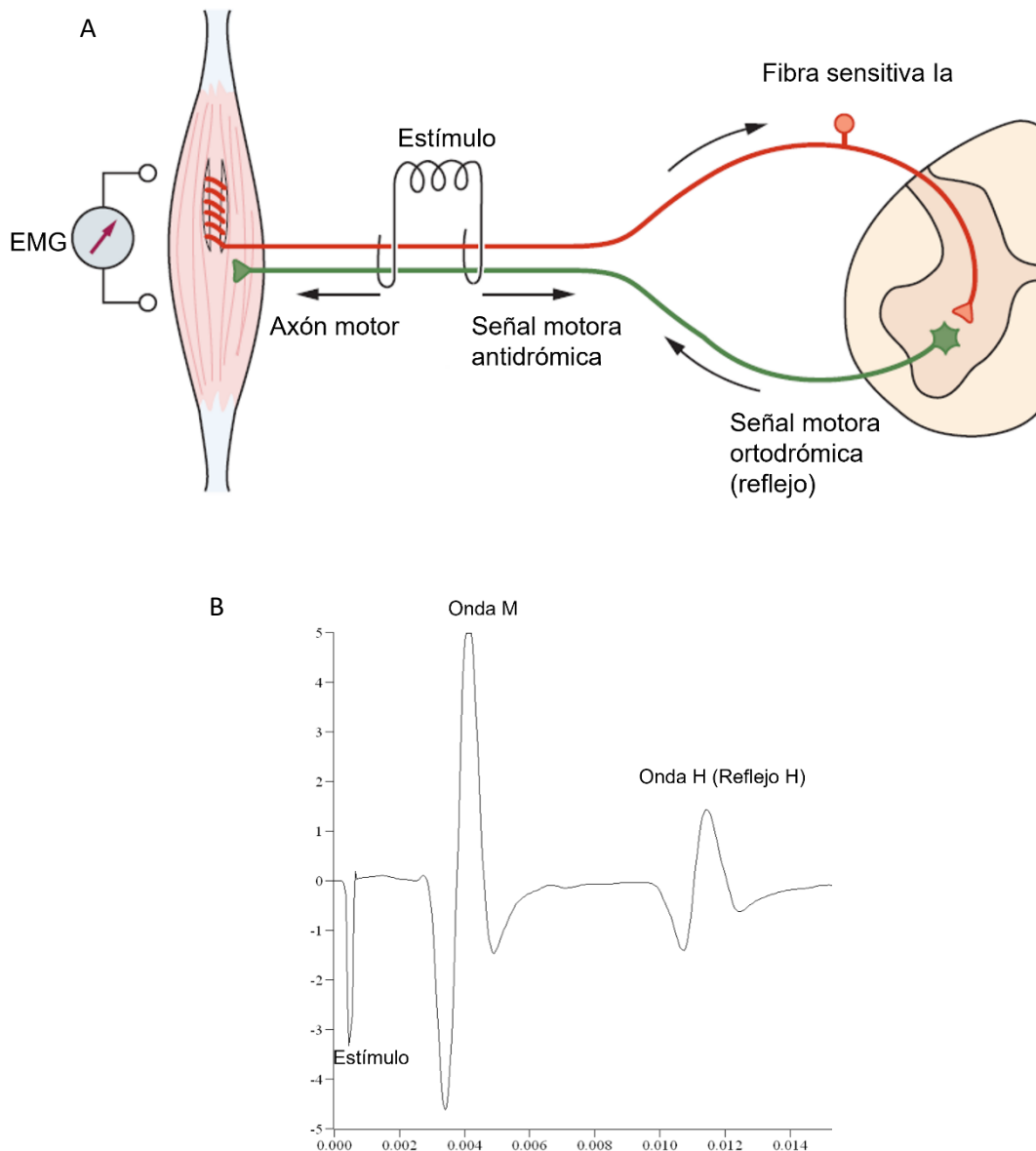


Figura 8: A. Esquema del EMG para evocar el reflejo H. B. Ejemplo del resultado del EMG. Modificado de (51).

Con esta técnica se pueden analizar diversas variables (TABLA 3), como pueden ser (187):

Tipo de medida	Mecanismo	Relación con la patología
Ratio Hmax/Mmax.	Porcentaje del <i>pool</i> de motoneuronas que pueden ser activadas.	Medida aproximada de la excitabilidad del <i>pool</i> de motoneuronas. Se relaciona con los signos clínicos de los síndromes de motoneurona superior.
H media.	Porcentaje del <i>pool</i> de motoneuronas que pueden ser activadas	Medida efectiva de los cambios en la excitabilidad del <i>pool</i> de motoneuronas. Podría utilizarse como monitorización a largo plazo en pacientes de ELA.
Reflejo-H de unidad motora única.	Función sináptica central de las motoneuronas individuales.	El <i>jitter</i> medio en el reflejo H es superior en pacientes de ELA. Puede reflejar cambios en la excitabilidad del <i>pool</i> de motoneuronas.
Inhibición vibratoria del Reflejo-H del sóleo.	Inhibición presináptica.	La interrupción de la influencia supraespal facilitadora en las interneuronas la inhibitorias, mejora la excitabilidad de las motoneuronas alfa al estiramiento.
Tiempos de reacción en la relajación muscular.	Inhibición presináptica.	El descontrol de las interneuronas que median la inhibición presináptica induce una relajación muscular defectuosa.
Reflejo-H condicionado (Pierrot-Deseilligny).	Inhibición recurrente.	Correlación positiva entre el descenso del nivel de inhibición y la espasticidad en ELA. Relacionado con la vía de Renshaw.
Reflejo-H condicionado (Tanaka).	Inhibición recurrente.	Modificación de la actividad de las interneuronas inhibitorias la que actúan en el sóleo.

Tabla 3: Variables susceptibles de analizar con el reflejo H.

Los músculos en los cuales más se ha utilizado esta técnica son el sóleo y el gastrocnemio. En situaciones fisiológicas, la estimulación vibratoria de este nervio ocurre a la vez que la estimulación eléctrica cuando se está registrando el reflejo H, lo cual resulta en una inhibición de los impulsos aferentes y una reducción de las amplitudes del reflejo H. Por el contrario, en situaciones patológicas donde hay un estado excitatorio, la reducción de la amplitud debida a la estimulación vibratoria no es tan evidente, lo cual estaría relacionado con una reducida activación GABAérgica (ácido γ -aminobutírico) (188).

En el sóleo, existen diversos factores que pueden limitar el tamaño del reflejo H, entre ellos nos encontramos con la imposibilidad de activar a todas las motoneuronas debido a sus diferentes umbrales de activación, o con que el aumento de la onda M previene el crecimiento del reflejo H debido a la colisión que existe entre la descarga del reflejo ortodrómica y la descarga antidrómica de los axones motores (191).

En pacientes de ELA, se observó que los cambios en la excitabilidad del reflejo H, seguido de una relajación correlacionaba con el grado de espasticidad. En los pacientes más severos no se observa inhibición presináptica (192). Además, la ratio Hmax/Mmax refleja los signos de síndrome de motoneurona y se incrementa con el aumento de la espasticidad, además de correlacionar con la hiperreflexia y el signo de Babinski. En los pacientes con afectación de motoneurona superior esta ratio está ligeramente aumentada, sin embargo, en los pacientes con afectación de motoneurona inferior era menor (187, 188). Cuando se administra medicación miorrelajante, la ratio Hmax/Mmax no se ve alterada por lo que esta variable no es de ayuda para poder estudiar los resultados de los tratamientos (193).

Un parámetro más sensible que la ratio Hmax/Mmax para evaluar la hiperreflexia es la Hmedia, ya que permite evaluar las modificaciones en la excitabilidad durante el progreso de la enfermedad. Los pacientes que presentan un aumento en la amplitud de la Hmedia presentan un curso de la enfermedad más lento y mayor supervivencia que los que presentan un descenso en la Hmedia (187, 194).

En los primeros estadios de la enfermedad, la amplitud del reflejo H en relación con la onda M puede ser normal o incluso algo superior a lo esperado. Sin embargo, en los estadios finales se observa una disminución del reflejo H más pronunciada en pacientes con un patrón de baja sensibilidad motora generalizada (187).

La variación media de la latencia en el estudio de motoneurona única es significativamente superior en los pacientes que en la población sana. Esto tiene relación con los cambios en la excitabilidad del *pool* de motoneuronas, lo que correlaciona con las propiedades electrofisiológicas de las motoneuronas que se encuentran alteradas en esta patología (187).

En un estudio realizado en 36 pacientes de ELA, los datos de la inhibición recurrente y vibratoria demostraron que existe una desinhibición de las motoneuronas de la médula espinal tras las lesiones de las motoneuronas superiores (188).

Recientemente se ha evaluado el reflejo H del músculo masetero en pacientes de ELA. En este caso además de desencadenarse el reflejo H homónimo, la estimulación de este nervio puede evocar el reflejo H heterónimo en el músculo temporal. Este actúa de forma diferente al homónimo ya que cuando la intensidad del estímulo aumenta este reflejo no desaparece, sino que se mantiene y aumenta su amplitud. Los resultados de este estudio determinaron que el reflejo del músculo temporalis en pacientes de ELA es mucho más excitable que en los sujetos sanos, lo que permitiría su uso para la detección de daños en el tracto corticoespinal y así usar este reflejo para evaluar la excitabilidad del *pool* de motoneuronas bulbares (195).

A pesar de estos resultados en pacientes de ELA, existen pocos estudios que analicen el reflejo H en la ELA, esto es debido a diversos problemas metodológicos tales como la localización de los electrodos de estimulación, la determinación del umbral motor, debido a que la estructura de los nervios y músculos cambia constantemente y, por último, la reproducibilidad de la técnica a causa de la reducción del número de motoneuronas con el progreso de la enfermedad. Sin embargo, su estudio podría presentar ventajas para conocer la excitabilidad de las motoneuronas a lo largo del curso de la enfermedad. El parámetro más efectivo para evaluar estos cambios sería la Hmedia debido a su fiabilidad y a que se puede analizar a lo largo de toda la enfermedad (187).

Vía piramidal y ELA

El control de los movimientos musculares en el cerebro humano es un proceso complejo, además de delicado debido a que se ven involucradas diferentes áreas del cerebro, cada una responsable de funciones específicas. Todo este control sucede a través de la vía piramidal (FIGURA 10) (196, 197).

La vía piramidal, se origina en la corteza cerebral y se divide en dos tractos principales, el corticobulbar y el corticoespinal. Ambos tractos recogen señales eferentes y las envían al tronco cerebral y a la médula espinal, respectivamente (196, 197).

El tracto corticoespinal, se origina de forma primaria en las cortezas frontoparietales (corteza motora primaria, área motora secundaria y corteza somatosensorial), posteriormente todas las señales convergen formando haces que viajan a través de la cápsula interna y los pedúnculos cerebrales, tras ello, atraviesan el tronco cerebral y los núcleos pontinos donde los haces se compactan aún más, para atravesar el bulbo raquídeo, a partir de aquí, se produce un proceso de decusación en la médula espinal donde en torno al 75-90% de las fibras decusarán al sitio contralateral de la corteza de la que provenían formando la parte lateral del tracto corticoespinal. Estas fibras, cuando llegan al nivel diana sinaptarán directamente con las neuronas del asta anterior (198, 199).

Sin embargo, entre el 5 y 15% no decusarán. Estos haces que no decusan, se extienden por la médula espinal hasta niveles torácicos formando la parte anterior del tracto corticoespinal. Cuando llegan los haces al nivel diana, las fibras del tracto corticoespinal anterior decusarán a través de la comisura de la materia blanca anterior antes de sinaptar con las neuronas del asta anterior de la materia gris (198).

Tras las sinapsis, tanto del tracto anterior como del lateral, las neuronas proyectarán a los músculos de las extremidades y músculos axiales para que se realicen las funciones motoras correspondientes (198, 199).

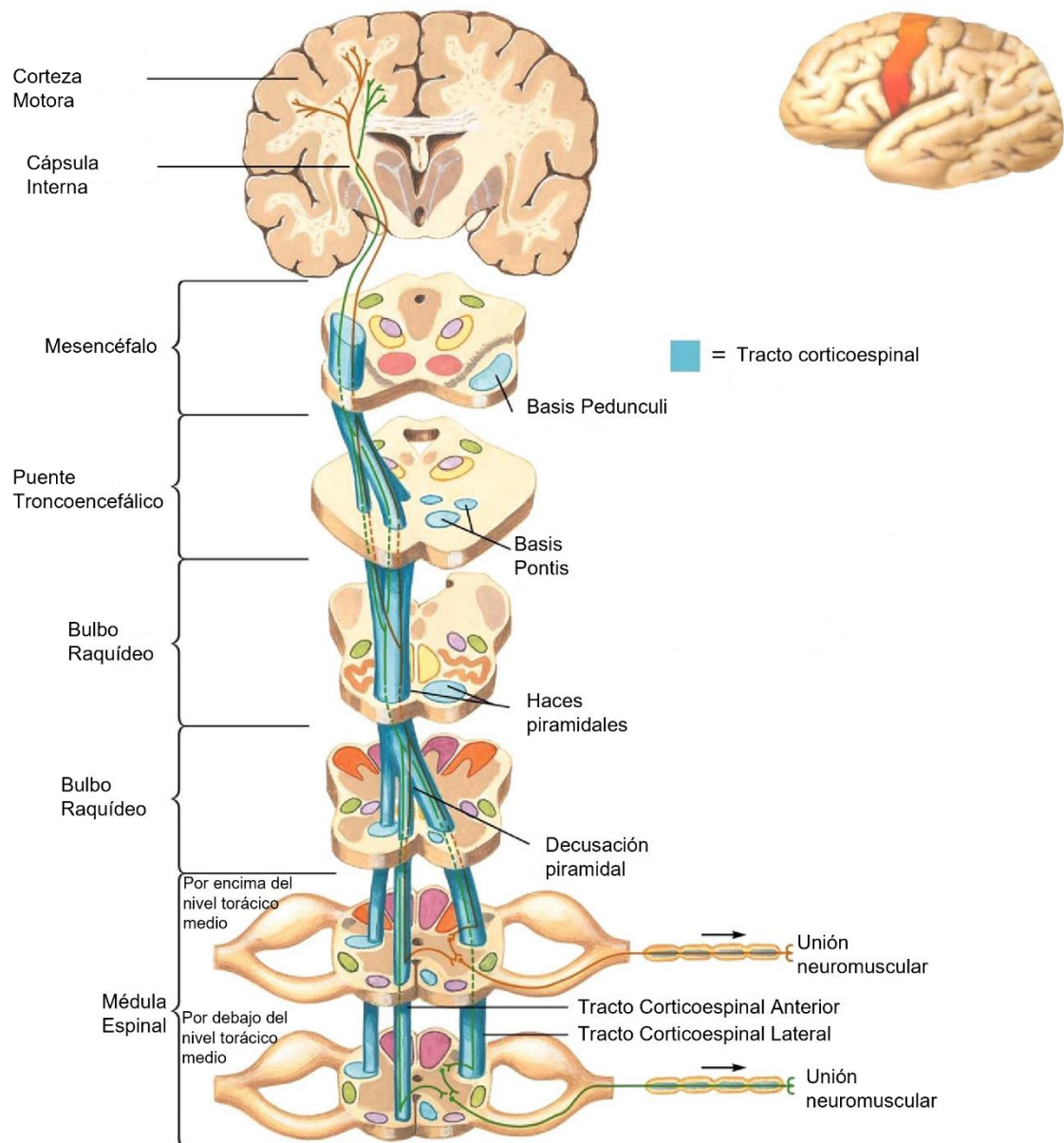


Figura 9: Ilustración de la vía corticoespinal. Modificado de (199).

Una de las principales características de la ELA es la degeneración de este tracto corticoespinal, lo que conlleva una disfunción en las motoneuronas superiores e inferiores (201). La disfunción de las motoneuronas superiores provoca síntomas como la espasticidad, debilidad, activación de los reflejos y de la respuesta plantar extensora (202).

Los pacientes de ELA muestran hiperintensidades del tracto corticoespinal en las secuencias T2 de resonancia magnética, además de una reducción de la anisotropía y un aumento de la difusividad de este tracto (202). De hecho, uno de los primeros cambios detectables en las resonancias magnéticas son los cambios en la anisotropía de la materia blanca del tracto corticoespinal, ocurriendo en primer lugar de forma distal y posteriormente de forma proximal (203, 204).

Que el tracto corticoespinal sea una región afectada de forma primaria en esta patología, la convierte en una región interesante para su estudio, es por ello que este trabajo se basará en el estudio de esta vía tanto histológica como electrofisiológicamente.

Modelos animales

A pesar de todo lo que se conoce de esta patología, tal y como se ha comentado en apartados anteriores, los mecanismos que subyacen a esta patología no están del todo esclarecidos. Por ello, es fundamental el desarrollo de modelos experimentales que permitan dilucidar estos mecanismos, así como para la búsqueda de posibles tratamientos.

Modelo Wobbler

El modelo de ratón Wobbler fue descubierto por primera vez por Falconer en 1956 (205). Consiste en una mutación autosómica recesiva espontánea en la cepa C57BL/F (206, 207). Dicha mutación se localiza en el cromosoma 11, la cual es homóloga de la región del genoma humano 2p13 (206, 208, 209). Esta mutación presenta relación con la degeneración de las motoneuronas y es provocada por un cambio puntual en el último exón del gen *Vps54* (*Vacuolar Protein Sorting-Associated Protein 54*), provocando un cambio (206-209) de leucina a glutamina en el dominio C-terminal de la proteína Vps54 (206, 210). Este gen codifica para uno de los componentes de la proteína retrograda asociada al Golgi, que participa en el transporte vesicular retrogrado (211, 212).

La sintomatología de este modelo se divide en 3 fases: una primera fase presintomática, una evolutiva y por último una fase estable.

La fase presintomática, se extiende desde el nacimiento hasta las 3 semanas. Durante esta fase se observan pequeños síntomas no clínicos mientras que el peso, la fuerza de agarre y el reflejo de enderezamiento se mantienen normales (206, 207, 213). Sin embargo, en esta fase se observan rasgos histopatológicos, como es la vacuolización en las motoneuronas espinales (213, 214), un marcaje débil de los cuerpos de Nissl y los somas aumentados (207), además muestran astrogliosis, microgliosis y reducción en el número de oligodendrocitos (215).

Durante la fase evolutiva, que se extiende hasta los 3 meses de edad, se observan cambios clínicos, morfológicos y moleculares. Los animales presentan pérdida muscular y de peso, además de desarrollar temblor en la cabeza. A pesar de que las extremidades traseras se ven menos afectadas, la debilidad de las extremidades anteriores y músculos del cuello se desarrolla rápidamente (206, 207, 213).

Tras esta rápida progresión sintomática se produce una fase de estabilización sintomática, que se alarga hasta la muerte del animal. Esta fase está caracterizada por una detención de la degeneración de las motoneuronas (206, 207, 213) así como, por la vacuolización de endosomas, el deterioro del transporte axonal, agregación proteica y disfunción mitocondrial. Además, presentan neuroinflamación y deficiencias en las sinapsis neuromusculares (211, 213). Los niveles de ROS en esta fase se encuentran significativamente elevados en la médula espinal de estos animales (10, 216).

Estos animales presentan hiperexcitabilidad cortical, explicada principalmente por la pérdida de neuronas GABAérgicas. Esto se corroboró en estudios en los que encontraron un aumento de la excitabilidad en la región CA1 (cuerno de Ammón 1) del hipocampo, en conjunto con un menor número de interneuronas inhibitorias durante la formación hipocampal (217).

Este modelo se ha utilizado para testar la eficacia de tratamientos en el curso de la degeneración de motoneuronas (213). Entre ellos se ha testado el Riluzol, el cual ha demostrado reducir el deterioro motor en este modelo (217). Estos animales presentan una sobrerregulación de los niveles de cortisona en las glándulas adrenales, plasma y diversas regiones de la médula espinal y del cerebro, sin embargo, los niveles de testosterona en los testículos, plasma, médula espinal y cerebro son significativamente menores en estos animales (10, 215, 218). Lo que correlaciona con una de las principales características de este modelo que es que los machos, a pesar de la normal apariencia de los aparatos genitales, son estériles (213).

Por otro lado, con estos animales se ha visto que el tratamiento con progesterona y la alopregnanolona provoca un descenso en la neuroinflamación mediante una regulación a la baja de la reactividad glial, además de que funcionan como agentes neuroprotectores promoviendo la supervivencia neuronal (215).

La nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) juega un papel fundamental en el proceso de eliminación de las ROS, así como en el metabolismo energético y la función mitocondrial. También presenta propiedades protectoras contra la muerte neuronal mediada por PARP-1 (Poli (ADP-Ribosa) polimerasa 1) y frente a la degeneración axonal inducida por la excitotoxicidad. Las médulas espinales de los ratones Wobbler presentan niveles disminuidos de NAD^+ . En estudios *in vitro* con motoneuronas procedentes de ratones Wobbler se ha visto que la adición exógena de NAD^+ o de cafeína mejora el desarrollo de las motoneuronas (216).

La principal desventaja de este modelo es que, a pesar de que es una mutación espontánea y podría servir para estudiar los casos esporádicos de la enfermedad, esta se ha encontrado en muy pocos casos humanos (206, 211). Es por ello que se considera un buen modelo para las enfermedades de motoneurona en vez de para la ELA (206, 207).

Modelo SOD1

El primer modelo animal SOD1 fue creado en 1994. En este modelo se introdujo la mutación G93A (219, 220). Los modelos basados en esta mutación son los más utilizados para el estudio de la ELA (221-223), sin embargo, existen más de 10 modelos mutantes de SOD1, entre ellos encontramos SOD1-G37R, SOD1-G85R o SOD1-G86R (224).

Los diferentes modelos de SOD1 dependiendo de la mutación específica que porten, del número de copias, de los niveles de expresión de la proteína o el género, presentan variabilidad en cuanto a la edad de inicio de los síntomas clínicos, la progresión y la supervivencia (219). No obstante, de forma general, los ratones que sobre-expresan las mutaciones de SOD1 presentan pérdida significativa de motoneuronas, denervación axonal, parálisis progresiva, agregación proteica y una esperanza de vida reducida (223, 225).

Los principales hallazgos en los modelos SOD1 son un inicio temprano de la astrogliosis y microgliosis, excitotoxicidad mediada por glutamato, déficits en el transporte axonal, vacuolización mitocondrial, procesamiento aberrante de los neurofilamentos y soporte metabólico reducido en las motoneuronas (22, 226, 227).

En un primer momento se pensó que la enfermedad era causada por una pérdida de la actividad, sin embargo, los ratones *knock-out* (KO) para *Sod1* no desarrollaban ELA (219, 220).

Generalmente, los animales SOD1-G93A sobre-expresan la mutación humana *SOD1G93A*. Estos animales presentan signos clínicos y neuropatológicos que correlacionan con ELA-F, como son parálisis de las extremidades con atrofia de los músculos esqueléticos (228, 229). Además, muestran alteraciones en las estructuras dendríticas de las motoneuronas superiores, neuronas piramidales del córtex prefrontal y en las motoneuronas inferiores del tronco del encéfalo y la médula espinal (221). La denervación muscular precede a la pérdida de las motoneuronas y a la atrofia muscular (229).

La neurodegeneración en este modelo sucede desde la semana 8 en la materia blanca ventral y en los nervios periféricos antes de extenderse a la materia gris ventral en la semana 10 (228). A pesar de la muerte de las motoneuronas, en estos ratones la capacidad respiratoria se preserva hasta el final de la enfermedad (230).

Por otro lado, la contractilidad de los músculos de estos animales precede a la reducción de la conectividad en la unidad motora. Además, la atrofia muscular ocurre de forma posterior a estos procesos (231). Este modelo también ha permitido descubrir que el declive progresivo de las proyecciones corticoespinales y bulboespinales sucede anteriormente al inicio de los síntomas clínicos (224).

Los ratones SOD1-G93A presintomáticos y sintomáticos muestran una evidente astrogliosis, tanto en el cerebro como en la médula espinal. En el último estadio de la enfermedad, cuando las motoneuronas ya se han perdido, el número de astrocitos activados está aumentado en la médula espinal, el núcleo motor trigeminal del tronco del encéfalo y en la corteza motora primaria (224).

A pesar de la pérdida de las motoneuronas frénicas, las ratas SOD1-G93A, al igual que sucedía con los ratones, mantienen la capacidad respiratoria. Sin embargo, la actividad del nervio frénico se reduce aproximadamente un 50%, lo que sugiere un mecanismo (plasticidad) compensatorio en los *inputs* sinápticos para suplir a las motoneuronas frénicas, amplificando así su actividad individual (230).

En los mutantes SOD1-G93A existe una reducción del flujo sanguíneo y un aumento del uso de la glucosa en la médula espinal durante la fase presintomática, lo que sugiere que la pérdida de oxígeno y el desacoplamiento del metabolismo posiblemente induciría la muerte de las motoneuronas (232). La resistencia a la insulina ha demostrado jugar un papel en la progresión de la enfermedad en modelos animales (15).

Los animales SOD1 muestran excitotoxicidad, la cual puede aparecer debido a cambios en las propiedades eléctricas intrínsecas de las motoneuronas, o debido a un incremento de las propiedades de las sinapsis excitatorias. Esta excitabilidad intrínseca de las motoneuronas se produce en los primeros estadios e incluso durante el estado embrionario (233).

La degeneración y muerte de las motoneuronas se asocia con el incremento de la peroxidación lipídica, la cual lidera la ferroptosis. Esta ferroptosis es un proceso oxidativo de muerte celular dependiente de hierro. Cuando en los animales *SOD1-G93A* se sobreexpresa GPX4 (Glutación peroxidasa 4), una enzima que reduce la ferroptosis, se observa un inicio tardío de los síntomas, una mejora en la función locomotora, lo que correlaciona con la disminución de la muerte de las motoneuronas. Como consecuencia de todo esto la esperanza de vida de estos animales aumenta (234).

Los ratones que sobreexpresan *SOD1-G37R*, no presentan alteraciones durante los primeros meses de vida, sin embargo, comienzan a desarrollar signos clínicos a partir de los 4 meses de edad. Presentan disminución del movimiento, dificultad para mover y extender las extremidades, así como temblores, debilidad asimétrica en las extremidades, pérdida de peso progresiva y los datos electromiográficos muestran ondas agudas espontáneas características de la atrofia. Los datos histológicos de estos ratones muestran vacuolas principalmente en el neuropilo del asta ventral, particularmente en las dendritas y reducción de las motoneuronas en la zona lumbar de la médula ósea (235).

En los ratones *SOD1 (G37R)*, la degeneración de las neuronas serotoninérgicas es la responsable de la hiperreflexia en estos animales. Esta hiperreflexia es un mecanismo compensatorio a los déficits motores, permitiendo el mantenimiento de la función motora tras el inicio de la enfermedad (236). En un estudio reciente utilizando estos ratones se ha visto que existen diferencias entre sexos en la formación de nuevas ramas axonales observando que, a pesar de que estas nuevas ramas estaban incrementadas en los ratones hembra, también presentaban mayor pérdida neuronal y denervación de las uniones neuromusculares, lo que podría ir en detrimento de la progresión de la enfermedad (237).

A pesar de que este modelo desarrolla la mayoría de los hallazgos neuropatológicos de ELA (238, 239), queda por demostrar aún si estos hallazgos pueden extrapolarse a otras formas de ELA familiar o esporádica. En concreto este mutante ha sido criticado debido a su poco valor predictivo para testar potenciales terapias (238).

La proteína TDP43 se descubrió debido a sus efectos en la transcripción del virus de la inmunodeficiencia humana (240). Está codificada por el gen *TARDBP* en el cromosoma 1. Contiene una señal de localización nuclear (220, 240, 241), dos dominios de unión a ARN y una región rica en glicina, región en la cual se han identificado la mayoría de las mutaciones patogénicas para ELA (240).

Esta proteína juega un papel en el procesamiento del ARN y en la regulación del *splicing* (220, 240, 241), además de ser crítica para la función y la supervivencia de las neuronas debido a que, si se altera la señal de localización nuclear, aumenta la neurotoxicidad (241).

Esto provoca que esta proteína sea el mayor componente patológico de las inclusiones citoplasmáticas en la ELA DFT. Las mutaciones de esta proteína representan al 4% de las ELA-F (220), pero las inclusiones se encuentran en la mayoría de los casos de ELA (220, 242).

El primer modelo transgénico de proteinopatía TDP43 fue creado por Robert Baloh y colaboradores en 2009. Este modelo expresa la mutación A315T bajo el control de un promotor de ratón. Estos animales generan aproximadamente 3 veces más proteína mutada que la endógena, expresándose el transgén en el cerebro y médula espinal (243, 244).

Estos animales muestran síntomas motores a los 3 o 4 meses de edad, y a los 4 meses y medio ya no son capaces de soportar su propio peso utilizando sus extremidades para deslizarse. Las necropsias de estos animales muestran degeneración de los axones motores y también se observa que presentan una disminución del 20% en el número de motoneuronas respecto a los controles. Estos ratones presentan una mayor afectación de las motoneuronas superiores que el modelo SOD1 (243, 244).

La toxicidad inducida por TDP43 es dependiente de los niveles de expresión del transgén. Con una expresión intermedia de TDP43 se observa un fenotipo atenuado en comparación con los animales que expresan altos niveles de TDP43. Tanto TDP43 *wild-type* como la mutante, son neurotóxicas si se sobreexpresan (245).

Los ratones que sobreexpresan la TDP43 humana o una mutación de este gen asociada a la ELA presentan acumulación de ubiquitina, fragmentación de la TDP43, astrogliosis, microgliosis, degeneración axonal, pérdida neuronal, discapacidad motora y esperanza de vida reducida (246). La sobreexpresión de la mutación M337V provoca la pérdida severa de motoneuronas, degeneración de la unión neuromuscular y muerte prematura (242).

Utilizando ratones transgénicos para la TDP43 humana, se ha podido determinar que la proteína TDP43 de ratón está significativamente disminuida respecto a los controles, lo que sugiere que la proteína humana podría regular la expresión de la de ratón a través de la baja regulación del ARN *Tardbp*. Pero a pesar de que la expresión de la TDP43 de ratón se reduce, esta reducción no lidera la pérdida de función ya que la TDP43 humana compensa la pérdida funcional, por tanto, este tipo de animales no serían una buena herramienta para estudiar la pérdida de la función de mTDP43 (246).

Los ratones que expresan de forma inducible la mutación patogénica A315T en las neuronas del SNC, muestran atrofia cortical e hipocampal temprana, asociada a la pérdida de las neuronas que expresan la TDP43 humana mutada, y astrogliosis reactiva. También mostraron localización citoplasmática de la proteína, fragmentos fosforilados, así como una elevada ubiquitinación en el cerebro de estos ratones. De forma funcional, estos ratones presentan déficits de memoria progresivos, hiperactividad, desinhibición y discapacidad motora, siendo esta última asociada a la expresión de la TDP43 mutada y a su acumulo en las motoneuronas alfa en la médula espinal (247).

TDP43 es un ligando de Oxr1 (proteína de resistencia a la oxidación 1). Esta proteína pertenece a la familia de proteínas que contienen el dominio TLDC (dominio catalítico), el cual confiere la protección frente al estrés oxidativo. La sobreexpresión de la isoforma Oxr1-C reduce la agregación citoplasmática de la TDP43 en los mutantes M337V y Q331K, lo cual sugiere que Oxr1 posee el potencial de reducir la patología asociada a TDP43, como puede ser la disfunción mitocondrial y la apoptosis inducida por el estrés oxidativo (242).

Teniendo en cuenta los animales transgénicos para TDP43, se considera que al observar pocas inclusiones de TDP43, su agregación no sería el factor neurotóxico inicial en estos animales. Sin embargo, la deslocalización y fragmentación observada en varios modelos sugiere que éstas pueden jugar un papel en la neurodegeneración (245).

Modelo FUS

Las mutaciones de *FUS* representan el 1% de la patología esporádica y el 4% de la familiar. *FUS* es una proteína nuclear relacionada con múltiples pasos de la expresión génica, como la transcripción del ARNm, el *splicing*, el transporte y la traducción. En las neuronas, se encuentra en axones, dendritas y sinapsis excitatorias. La mayoría de las mutaciones de *FUS* son mutaciones con cambio de sentido y se localizan en la secuencia del dominio C-terminal de la localización nuclear (NLS) (248). Tras el descubrimiento de la implicación de *FUS* en la patología de la ELA (249) se han desarrollado varios modelos animales utilizando mutaciones de esta proteína, incluyendo *knock-outs*, y sobreexpresión tanto del *FUS* mutante como del *wild-type* (250).

Los ratones KO *Fus/Tls* (Translocated in liposarcoma) mueren inmediatamente tras el nacimiento mostrando esterilidad e inestabilidad cromosómica (220, 251-253). Las neuronas deficientes de *FUS/TLS* muestran unas espinas con menos densidad y morfología anómala. En este modelo no se produce pérdida de motoneuronas, por lo que la patogénesis estaría relacionada con una ganancia de función (251). Otros grupos han usado la misma técnica KO, pero han generado un modelo en el que obtienen una expresión baja del gen con una proteína truncada y no funcional. Sin embargo, en este caso sólo se estudió el modelo desde un punto de vista del sistema reproductivo y no desde la neuropatología (252). Recientemente se ha estudiado la neuropatología del modelo KO observándose pérdida de peso, pero no fenotipo motor y siendo el número de las neuronas acetilcolintransferasa positivas normal. La falta del fenotipo motor y la neurodegeneración en estos ratones sugiere que la disminución sólo de *FUS* es insuficiente para causar los síntomas de ELA (252).

Scekic-Zahirovic J. y colaboradores generaron un modelo de ratón condicional *knock-in* en el cual se eliminaron tanto *Nls* como *Fus*. Con este modelo vieron que *FUS* estaba completamente deslocalizado en el citoplasma de los ratones homocigotos, lo que provocaba la degeneración de las motoneuronas en neonatos. Los ratones heterocigotos muestran parcialmente la patología *FUS*-ELA. Con ello demostraron que la mutación en *FUS* está asociada a la degeneración de motoneuronas a través de la deslocalización de *FUS* en estas células, mientras que el daño axonal y la desmielinización ocurren independientemente de la expresión del mutante *FUS* en las motoneuronas (248).

La sobreexpresión de FUS, tanto *wild-type* como mutante, desencadena la degeneración de las motoneuronas, sugiriendo que la proteína mutante tiene una ganancia de función tóxica que lidera la neurodegeneración más agresiva (248). La sobreexpresión de *hFUSwt* muestra un fenotipo más agresivo en los homocigotos, que desarrollan discapacidad motora, la cual desemboca en parálisis, y muestran un aumento de la FUS citoplasmática pero no son inclusiones ubiquitinadas. Se observa pérdida de motoneuronas en el asta anterior de la médula lumbar, daño en la unión neuromuscular y gliosis (220, 253).

Devoy A. y colaboradores han generado un modelo murino que consiste en introducir en el *locus* del gen *Fus* de ratón la mutación *FUSDelta14* humana, la cual se relaciona con la ELA. Este modelo sintetiza la patología FUS-ELA humana definida por un inicio con mediana edad y una progresiva degeneración de las motoneuronas con una herencia dominante. Los resultados se obtuvieron del análisis del comportamiento motor, fisiología muscular para evaluar la innervación y función de los músculos de las extremidades y análisis patológico de las motoneuronas espinales (250).

En ratas, Huang C. y colaboradores han generado un modelo transgénico de FUS mutante, el cual desarrolla axonopatía severa de las motoneuronas, denervación de los músculos esqueléticos y pérdida sustancial de las neuronas corticales e hipocampales. Sin embargo, ratas transgénicas con la FUS normal muestran déficits en la memoria y aprendizaje espacial, pérdida de neuronas corticales e hipocampales, acompañada de agregación de ubiquitina y reacción glial, desarrollando así algunos de los síntomas de la ELA y la DFT (249).

Recientemente se ha encontrado en diversos modelos animales que existe una homeostasis aberrante de las marcas epigenéticas. Una de estas marcas que están alteradas es la acetilación de las histonas. La supervivencia neuronal se ve afectada si existe un descenso en la acetilación de histonas. Rossaert y colaboradores evaluaron la eficacia de un inhibidor (ACY-738) de deacetilasas sobre el fenotipo de un ratón FUS. Encontraron que el tratamiento con este inhibidor reestablecía la acetilación de histonas además de las vías metabólicas en la médula espinal, lo cual provocaba que la progresión de la enfermedad fuera menor. Esto sugeriría que las histonas deacetilasas pueden ser una posible diana terapéutica (254).

Las expansiones del hexanucleótido en *C9ORF72* son la causa genética más frecuente de la ELA (aproximadamente representa al 35-45% de las ELA-F). La función de *C9ORF72* es desconocida, pero se ha sugerido que tendría un papel en el tráfico de proteínas (223, 255, 256). Las expansiones ocurren en la parte no codificante del gen (256). Se han descrito 3 mecanismos posibles para la patogenicidad de estas expansiones: secuestro de las proteínas de unión al ARN, toxicidad mediada por dipéptidos formados como resultado de la traducción no ATG asociada a la repetición y haploinsuficiencia (156, 255, 257).

Utilizando ratones con una reducción crónica de *C9ORF72* o expresando el gen humano con diferentes expansiones, se ha identificado una ganancia de toxicidad como mecanismo central de la enfermedad en el sistema nervioso central de los mamíferos (256). Eliminando los dos alelos del gen, se produce en los ratones esplenomegalia, aumento de los nódulos linfáticos cervicales y muerte prematura, además de déficits cognitivos en memoria de trabajo y evaluación de la ansiedad (220, 256).

Los ratones donde la expansión de la mutación está dirigida por las regiones reguladoras humanas muestran diferentes fenotipos incluyendo parálisis, comportamiento similar a la ansiedad, descenso en la supervivencia, neurodegeneración generalizada en el cerebro y médula espinal, siendo significativo en la corteza y el hipocampo (258).

Koppers y colaboradores sugieren que la pérdida de *C9ORF72* por sí misma es insuficiente para causar la ELA, sin embargo, no descartan la posibilidad de que la pérdida de función module el proceso de la enfermedad e influya en el inicio, la severidad y duración (255).

En contraste, otros investigadores se basan en la ganancia de función; utilizando ratones en los que se inducen 66 expansiones mediante AAV (virus adenoasociados), se observa que los cerebros de estos ratones muestran los hallazgos de la ELA como con la patología TDP43 o los déficits de comportamiento. Otros estudios han encontrado también inclusiones ubiquitinadas, pero no en las poblaciones neuronales relevantes y por lo tanto sin desarrollar el fenotipo motor (255).

Recientemente, dos grupos han generado modelos de ratón que expresaban proteínas de repetición de dipéptidos (156, 259). Choi y colaboradores generaron un modelo en el cual consiguen que los cerebros de estos ratones expresen menores niveles del dipéptido GR₈₀ mediante el control de un promotor inducible. Estos ratones muestran de manera asociada a la edad los mismos déficits de comportamiento social y deterioro de la función sináptica que se observa en la ELA, además de un ligero aumento de la muerte neuronal, microgliosis y astrogliosis. Por otro lado, presentan un déficit en la morfología y en la función de las mitocondrias. Este daño podría ser uno de los primeros eventos patogénicos que suceden en la enfermedad, ya que se observa previamente a los déficits de comportamiento y celulares (259).

Hao y colaboradores también generaron un modelo transgénico, en el cual los animales expresaban específicamente poli-PR (GFP-PR₂₈). Los ratones heterocigotos presentaban déficits motores, pérdida de células de Purkinje, activación de la microglía y de los astrocitos en el cerebelo además de en la médula espinal. Así mismo, la transmisión sináptica estaba desregulada en estos ratones, todo ello correlaciona con la patología de la ELA. Sin embargo, los ratones homocigotos morían prematuramente presentado altos déficits motores, posiblemente debido a la alta toxicidad de este dipéptido (156).

Modelo químico

Beta-N-metilamino-L-alanina (L-BMAA) es un aminoácido no proteico e hidrofílico producido por cianobacterias. Es altamente neurotóxico (238, 260). Este aminoácido está relacionado con diferentes enfermedades neurodegenerativas (238, 261, 262). La primera relación que se estableció entre L-BMAA y las enfermedades neurodegenerativas fue en la Isla de Guam en la que se vio una relación entre este aminoácido y el síndrome ELA-Parkinson ligado a demencias, aunque esta hipótesis es controvertida (261). En los pacientes de ELA, L-BMAA se acumula en el SNC como un aminoácido libre o integrado en proteínas. Tanto en la patología esporádica como en la familiar se observan estos agregados en el cerebro, lo que nos indicaría que se ven afectados mecanismos como el de la autofagia (263).

Se postularon tres mecanismos por los cuales este compuesto provoca su efecto neurotóxico: la activación directa de los receptores NMDA (ácido N-metil-D-aspartico), la activación de los receptores de glutamato metabotrópicos y la inducción del estrés oxidativo (261).

Munk y colaboradores, mediante inyecciones intraperitoneales, realizaron un análisis de las dosis que deben administrar y sus efectos, para así realizar una correlación entre los resultados obtenidos y patologías como la ELA, con el fin de buscar un modelo de ELA esporádica. Según sus resultados, la dosis 300mg/kg durante 5 días consecutivos es la dosis idónea para este modelo. En los animales tratados observaron que no existían diferencias en cuanto al peso, por lo que el desarrollo general no se veía afectado. Estos animales presentan déficits neuronales desde el día siguiente al inicio del tratamiento, así como dificultades en la coordinación motora. Mediante microscopia electrónica observaron que las motoneuronas se veían afectadas a nivel de médula espinal lumbar, fragmentación de retículo endoplasmático y polirribosomas libres, además las neuronas espinales presentan inflamación, vacuolización y mitocondrias alteradas (261), por lo que este modelo presenta varios de los hallazgos neuropatológicos encontrados en la ELA humana (238).

En un estudio posterior de este mismo grupo, realizaron la caracterización de este modelo centrándose en los posibles cambios morfométricos y de los niveles de neurotransmisores. Los resultados de dicho estudio muestran que existen varias fases en la evolución de los síntomas de los animales tratados. Una primera fase en la que se produce una rápida evolución de los síntomas que ocurre entre el primer y tercer mes tras el tratamiento, posiblemente debido a la excitotoxicidad causada en el SNC. En una segunda fase de estabilización los síntomas se desarrollan más lentamente, debido principalmente a los reservorios de L-BMAA del cerebro. Mediante resonancias magnéticas *in vivo*, se observó una pérdida progresiva del volumen muscular de las extremidades en los animales tratados en comparación con los controles. No se observó cambio en el volumen total de la corteza cerebral. Sin embargo, el volumen de los ventrículos laterales se ve agrandado en los animales tratados (238). Por otro lado, también estudiaron los cambios neuroquímicos a corto plazo mediante HPLC (Cromatografía líquida de alta eficacia) y a largo plazo mediante espectroscopia de resonancia magnética. A corto plazo, observaron niveles elevados de glutamato y taurina en la corteza motora, mientras que los niveles de GABA se encontraban disminuidos. A largo plazo, las concentraciones de glutamato estaban significativamente aumentadas respecto a los controles, los niveles de GABA estaban significativamente disminuidos, pero en los niveles de taurina no se observaron diferencias. Estos niveles alterados tienen relación con los mecanismos excitotóxicos que están envueltos en la neurodegeneración (238).

LCR Y ELA

La etiología de esta patología no se conoce, pero en los últimos años se ha avanzado en el conocimiento de la patogénesis de la enfermedad, encontrándose diferentes mecanismos que podrían estar involucrados. Sin embargo, no se ha conseguido dilucidar hasta qué punto cada uno de estos mecanismos contribuyen a la fisiopatología general (264).

Numerosas investigaciones se han centrado en la difusión de la patología de la ELA de forma física entre neuronas contiguas, ya sea de forma anterógrada como retrograda o mediante mecanismos que involucran contacto célula-célula, sin embargo, estos no explican ciertos datos clínicos e *in vitro*. Esto llevó a diversos autores a proponer que el LCR pudiera tener un papel crítico tanto en la causa como en la difusión de la enfermedad (265).

El LCR contiene proteínas y fragmentos de proteínas descargadas por las células afectadas, las cuales podrían servir como biomarcadores para las enfermedades neurodegenerativas, sin embargo, en la ELA, tiene más importancia el determinar cuál es el mecanismo que le confiere el carácter tóxico (266). El LCR se encuentra en contacto estrecho con numerosas regiones del SNC, circulando a través de los 4 ventrículos y del canal central de la médula espinal hasta el espacio subaracnoideo. Las células ependimarias de la superficie de los ventrículos permiten la difusión de macromoléculas entre el fluido intersticial y el parénquima cerebral. Además, existe una microcirculación de LCR que se origina en la superficie pial y transporta moléculas al tejido cerebral mediante el transporte a través de los espacios perivascuales de los vasos sanguíneos penetrantes (265).

Algunos estudios tanto *in vivo* como *in vitro*, así como estudios de proteómica han sugerido que el LCR podría poseer un perfil neurotóxico y que podría estar implicado en el proceso de la enfermedad (264, 266-268). Sin embargo, no todos los pacientes presentan un LCR citotóxico ni se ha encontrado relación de este LCR tóxico con la supervivencia de los pacientes (269).

La mayoría de los hallazgos en la ELA se han realizado utilizando modelos transgénicos que no replican totalmente la patología esporádica (270). Existen diferentes estudios que confirman el efecto citotóxico del líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes de ELA en cultivo celular (266, 271). Con estos resultados y teniendo en cuenta la cercanía del LCR a la médula espinal, podría plantearse que el LCR fuera un mecanismo de difusión de la enfermedad (266, 270).

Algunos investigadores han observado que la inyección aguda y puntual de LCR-ELA provoca cambios en canales iónicos dependientes de voltaje de sodio y potasio (271). Otros estudios indicaron que se induce estrés oxidativo en las motoneuronas (272). Ratas tratadas con LCR-ELA muestran que los parámetros obtenidos en la prueba del Rota-Rod fueron menores que los niveles basales tomados con animales controles, además de que la fuerza de agarre de estos animales se vio seriamente afectada. También afectó la actividad neuronal de la corteza motora (270).

Recientemente, en un estudio donde inyectaban intratecalmente LCR-ELA, observaron atrofia en las fibras musculares, una disminución de la complejidad de las uniones neuromusculares, daño ultraestructural y aumento del estrés oxidativo, lo cual sugeriría que el músculo esquelético está involucrado en la patogénesis de la ELA (273). Sin embargo, al ser inyecciones puntuales no imitan el curso temporal de la ELA y no la reproducen (274).

Es por ello que nuestro grupo se planteó el estudio de los cambios histopatológicos y funcionales tras la infusión continua de LCR-ELA. Utilizando LCR citotóxico de pacientes de ELA, se rellenaron unas mini bombas osmóticas (ALZET®) las cuales se implantaron vía subcutánea, a las que se adjuntó una cánula de infusión de cerebro (ALZET®) que se implantó en el ventrículo lateral derecho de los animales. Los resultados de este estudio muestran cambios citohistoquímicos en cerebro y médula espinal que se asemejan a los encontrados en los pacientes de ELA. Se observó una activación microglial seguida de una astrogliosis, lo cual se observa tanto en pacientes con ELA como en el modelo SOD1-G93A. Dicho evento puede apoyar la idea de que la neuroinflamación es un proceso temprano en la patogénesis de la ELA (274).

También se obtuvo una sobreexpresión de S100 β (S100 *calcium-binding protein* β), la cual correlaciona con la supervivencia en la enfermedad. Los resultados mostraron también presencia citosólica de TDP43 colocalizada con ubiquitina, así como proteínas relacionadas con los cuerpos de Bunina. También se incrementaron los niveles de metalotioneína que podría indicar una reacción neuroprotectora en respuesta a la infusión de LCR-ELA citotóxico. Estos hallazgos pueden mejorar la comprensión de la patogénesis y evolución de la ELA (274).

Para testar la hipótesis de que el LCR constituye una ruta de difusión de la enfermedad se infundieron con LCR de pacientes de ELA-E ratones que sobreexpresaban la proteína TDP43wt. Los resultados indicaron que una infusión intracerebroventricular de 14 días generaba disfunciones motoras y cognitivas, así como cambios neuropatológicos tales como la proteinopatía TDP43, anomalías de los neurofilamentos y neuroinflamación. Además, se encontraron diversos mecanismos desregulados como son la organización citoesquelética, el tráfico de vesículas, la función mitocondrial y el metabolismo celular. Todo esto indicaría que el LCR podría estar involucrado en la difusión de la patogénesis de la ELA (275).

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Uno de los principales retos que presenta la Esclerosis Lateral Amiotrófica es el desconocimiento sobre las bases de su patología, a pesar de todas las investigaciones realizadas en cuanto a los mecanismos que subyacen la etiopatogenia de la enfermedad. Esto implica que no existe ninguna alternativa terapéutica farmacológica con resultados favorables que logren curar o mejorar sustancialmente a los pacientes.

A esto se suma que la mayoría del conocimiento que se tiene de esta patología está fundamentada en modelos animales basados en las mutaciones que provocan las variantes familiares de la ELA. Esto hace que todas las investigaciones solo representen a un número muy reducido de pacientes. Además, estos modelos no representan la totalidad de los hallazgos clínicos y neuropatológicos encontrados en los pacientes con ELA esporádica.

En la actualidad existen muy pocos modelos animales que estudien la patología esporádica, a pesar de que es la mayoritaria. Existe un modelo basado en la neurotoxina L-BMAA que pretendía representar a la patología encontrada en la isla de Guam, sin embargo, esta neurotoxina no solo afecta a las motoneuronas, sino que se ven también otro tipo de neuronas como las dopaminérgicas, por lo que no es tampoco un modelo que represente la ELA exclusivamente.

Paralelamente en los últimos años, trabajos previos realizados por nuestro grupo han descrito que el LCR de pacientes de ELA es citotóxico para las motoneuronas en cultivo, lo que hizo plantear que el líquido citotóxico podría ser un medio de difusión de la enfermedad y, que la infusión continua de este LCR intraventricular en roedores sería un buen modelo para estudiar la patología esporádica. Los resultados indicaron que esta forma de generación del modelo es válida ya que recapitula los hallazgos obtenidos en la patología humana.

Con estos resultados previos, en el presente trabajo de tesis doctoral nos planteamos si la infusión intracerebroventricular en ratas bajo un modelo agudo (14 días) o crónico (42 días) puede desarrollar alteraciones conductuales, motoras, electrofisiológicas o histológicas similares a las presentadas en la patología humana.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

En los últimos años ha avanzado enormemente el conocimiento sobre la patogénesis de la ELA tanto esporádica como familiar, sin embargo, el mecanismo por el cual se desencadena la enfermedad sigue siendo desconocido. Por otro lado, se conoce que el LCR es selectivamente citotóxico para los cultivos de motoneuronas, pese a ello, todavía se desconoce el porqué de esta citotoxicidad.

Por su parte, la mayoría del conocimiento del cual se dispone está basado en los hallazgos encontrados en modelos animales basados en mutaciones familiares, las cuales representan exclusivamente a un número muy reducido de los pacientes de ELA. Además, estos modelos solo representan alguna de las características encontradas en los pacientes, por lo que no reflejan la patología al completo. Eso hace fundamental encontrar un modelo que permita reproducir la totalidad de la patología, así como representar a la mayoría de los pacientes incluidos en la patología esporádica.

Basándonos en los antecedentes incluidos en la introducción, y en el conocimiento por parte de nuestro grupo de investigación, de que la infusión continua intraventricular de LCR de pacientes de ELA en rata, provoca alteraciones histológicas similares a las encontradas en la ELA, nos planteamos la siguiente hipótesis:

Que la infusión intracerebroventricular, tanto aguda como crónica, de LCR de pacientes de ELA en rata, induce un cuadro histopatológico/ electromiográfico que abre la posibilidad de tener un modelo experimental de ELA esporádica.

Objetivos

Objetivos Generales

Los principales objetivos propuestos para la demostración de esta hipótesis han sido:

1. Comparar, en ratas, las alteraciones histológicas a punto final, provocadas por la infusión aguda y crónica intracerebroventricular de LCR de pacientes de ELA, frente a la infusión aguda y crónica intracerebroventricular de LCR de pacientes sin patología neurodegenerativa.
2. Estudiar los posibles cambios a nivel electrofisiológico que podría provocar dicha infusión de LCR a lo largo de todo el proceso experimental, mediante el estudio de los cambios en el reflejo de Hoffmann.
3. Analizar longitudinalmente si esta infusión afecta a nivel clínico a los animales y si estos comportamientos variarían a lo largo del estudio, mediante los test de Matsumoto, Plano Inclinado y el Análisis de la Pisada.

Objetivos Particulares

- I. Evaluar si existen cambios neuroinflamatorios tanto en la corteza motora como en la médula espinal.
- II. Evaluar los efectos que provoca la infusión de LCR sobre las motoneuronas de la corteza motora y de la médula espinal.
- III. Analizar los cambios producidos a nivel axonal, teniendo en cuenta los cambios provocados en la onda M.
- IV. Analizar los cambios producidos a nivel sináptico, teniendo en cuenta los cambios provocados en la onda H.
- V. Evaluar la posible alteración, tanto de la función como de la coordinación motora.
- VI. Evaluar la posible alteración en la fuerza de las extremidades de los animales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño Experimental

El diseño experimental de este estudio fue de tipo transversal, puesto que se analizaban variables recopiladas en un periodo de tiempo concreto sobre una muestra poblacional predefinida.

Descripción de las Variables

Variables independientes:

Tiempos de exposición de infusión intracerebroventricular (ICV)

Variables dependientes:

- Variación en la conducta exploratoria.
- Variación en la fuerza motora.
- Variación en los registros electromiográficos.
- Cambios en la morfología microglial y astrocitaria.
- Cambio en la morfología y el número de neuronas motoras.

Criterios de inclusión y exclusión de los animales experimentales

Criterios de inclusión:

- Registro de onda M y onda H en el día basal.
- No presentar signos de enfermedad previo al registro basal.
- No presentar infección sistémica tras el implante.
- No presentar reacciones adversas a la implantación.

Criterios de exclusión:

- Desprendimiento del implante ICV.
- Infección en la localización del implante.
- Alteraciones severas de la conducta y bienestar animal.

Líquido Cefalorraquídeo

Aspectos éticos

Los pacientes firmaron un consentimiento informado, previo a su inclusión y participación en el estudio. El manejo de los datos de los pacientes se realizó bajo el cumplimiento del Reglamento (UE) 2016/679 del Parlamento Europeo de 27 de abril de 2016, relativo a la protección de las personas físicas y de la Ley Orgánica 3/2018, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales, en vigor desde el 7 de diciembre de 2018.

Los datos de los pacientes fueron codificados y archivados con protección, de forma que sólo los investigadores tenían acceso a los mismos. El procesamiento de estos datos fue realizado exclusivamente por los individuos autorizados.

El proyecto se realizó de acuerdo con las normas de Helsinki (*Recommendations Guiding Physicians in Biomedical Research Involving Human Subjects*, Helsinki 1964, enmendadas durante la 52ª Asamblea General de la Asociación Médica Mundial, Edimburgo, Escocia, octubre de 2000).

LCR-ELA

Características y obtención de muestras

Las muestras de LCR-ELA, fueron obtenidas de pacientes diagnosticados de ELA definitiva, según los criterios de El Escorial revisados (184) y monitorizados en la Unidad de Neuromuscular del Hospital Clínico San Carlos. Las muestras fueron tomadas, previo consentimiento informado (ANEXO 1), mediante punción lumbar, cuando existía indicación clínica para dicha prueba durante el seguimiento de los pacientes. Tras su obtención, las muestras fueron alicuotadas y conservadas a -80°C hasta su uso.

Los criterios de inclusión y exclusión de los LCR para su uso en el presente estudio fueron los siguientes:

Criterios de Inclusión:

- Firma de consentimiento.
- Diagnóstico de ELA definitiva.
- Forma esporádica/familiar de la enfermedad.
- Mayores de 18 y menores de 95 años.
- Serologías negativas.
- Citotoxicidad *in vitro* sobre motoneuronas corticales.

Criterios de exclusión:

- LCR icterico o hemolizado.
- Serologías positivas para Herpes Zoster, HIV, meningitis, otras patologías.
- Debut oncológico.
- Daño neurológico por traumatismo o ictus.

A todos los pacientes incluidos se les registraron los siguientes datos demográficos: edad, sexo, tipo de ELA (esporádica o familiar), evolución, forma de inicio, tratamiento farmacológico y necesidad de respiración asistida.

En el Modelo Agudo, se utilizaron muestras de 17 pacientes de ELA, 9 mujeres y 8 hombres. Todos, salvo uno, presentaban la forma esporádica de la enfermedad, 6 de inicio espinal y 11 de inicio bulbar. La edad media en el momento de la extracción del LCR, fue de 64,88 años. Todos presentaban una evolución entre 2 y 31 meses (TABLA 4).

ID muestra	Sexo	Edad	ELA-E/ELA-F	Forma Inicio	Evolución
1	Hombre	66	ELA-F	Bulbar	2 meses
4	Hombre	70	ELA-E	Bulbar	3 meses
13	Mujer	46	ELA-E	Espinal	7 meses
14	Mujer	70	ELA-E	Bulbar	3 meses
17	Hombre	46	ELA-E	Espinal	7 meses
19	Mujer	74	ELA-E	Bulbar	6 meses
HC120	Hombre	51	Sin datos	Sin datos	Sin datos
HC 130	Mujer	79	ELA-E	Espinal	31 meses
HC 137	Mujer	62	ELA-E	Bulbar	7 meses
HC 138	Mujer	72	ELA-E	Bulbar	10 meses
HC 141	Mujer	87	ELA-E	Bulbar	13 meses
HC 143	Hombre	53	ELA-E	Espinal	4 meses
HC 149	Hombre	70	ELA-E	Espinal	20 meses
HC150	Mujer	58	ELA-E	Espinal/Bulbar	7 meses
HC 152	Hombre	71	ELA-E	Bulbar	Sin datos
HC 154	Mujer	64	ELA-E	Bulbar	8 meses
HC 175	Hombre	64	ELA-E	Espinal	24 meses

Tabla 4: Características clínicas de los LCR-ELA del Modelo Agudo. Se indican el número de identificación, el sexo, la edad, el fenotipo, la forma de inicio, así como el tiempo de evolución.

Por su parte, para el Modelo Crónico se han utilizado muestras procedentes de 15 pacientes de ELA, siendo 9 mujeres y 6 hombres. Todos ellos presentaban la forma esporádica de la enfermedad, siendo 9 de ellos de inicio espinal y 6 de inicio bulbar. La edad media de los pacientes en el momento de la extracción del LCR, fue de 67,53 años. Además, en ese momento, todos ellos presentaban una evolución de los síntomas entre los 4 y los 31 meses (TABLA 5).

ID muestra	Sexo	Edad	ELA-E/ELA-F	Forma Inicio	Evolución
HC 130	Mujer	79	ELA-E	Espinal	31 meses
HC 137	Mujer	62	ELA-E	Bulbar	7 meses
HC 138	Mujer	72	ELA-E	Bulbar	10 meses
HC 141	Mujer	87	ELA-E	Bulbar	13 meses
HC 143	Hombre	53	ELA-E	Espinal	4 meses
HC 144	Hombre	71	ELA-E	Espinal	+ 12 meses
HC 148	Mujer	47	ELA-E	Espinal	15 meses
HC 149	Hombre	70	ELA-E	Espinal	20 meses
HC 150	Mujer	62	ELA-E	Espinal	7 meses
HC 152	Hombre	71	ELA-E	Bulbar	Sin datos
HC 154	Mujer	64	ELA-E	Bulbar	8 meses
HC 156	Mujer	77	ELA-E	Espinal	11 meses
HC 157	Mujer	71	ELA-E	Espinal	13 meses
HC 158	Hombre	63	ELA-E	Bulbar	14 meses
HC 175	Hombre	64	ELA-E	Espinal	24 meses

Tabla 5: Características clínicas de los LCR-ELA del Modelo Crónico. Se indican el número de identificación, el sexo, la edad, el fenotipo, la forma de inicio, así como el tiempo de evolución.

LCR-Control

Características y obtención de muestras

Las muestras de LCR-Control se obtuvieron de pacientes que acudieron al servicio de Urgencias o a la consulta de Neurología del Hospital Clínico San Carlos y a los cuales, por indicación clínica, se les realizó una punción lumbar, previo consentimiento informado (ANEXO 1). Tras su obtención, las muestras fueron alicuotadas y conservadas a -80°C hasta su posterior utilización.

El criterio para ser considerada muestra control era no presentar patología infecciosa ni neurodegenerativa, así como ser negativo en el test de citotoxicidad de neuronas corticales.

En el Modelo Agudo se utilizó la muestra de un paciente diagnosticado de Hipertensión Intracraneal Idiopática (HII) / Hidrocefalia. El paciente presentaba en el momento de la toma de la muestra una edad de 68 años (TABLA 6).

ID muestra	Sexo	Edad	Motivo de la extracción de LCR
HC 22	Mujer	68	HII

Tabla 6: Características clínicas de los LCR-Control del Modelo Agudo. Se indican el número de identificación, el sexo, la edad, así como el motivo de la extracción del LCR.

En el Modelo Crónico se han utilizado 2 muestras de pacientes diagnosticados de HII. Los pacientes presentaban en el momento de la toma de la muestra una media de 66,5 años. Ambas muestras pertenecían a mujeres (TABLA 7).

ID muestra	Sexo	Edad	Motivo de la extracción de LCR
HC 25	Mujer	56	HII
HC 28	Mujer	77	HII

Tabla 7: : Características clínicas de los LCR-Control del Modelo Crónico. Se indican el número de identificación, el sexo, la edad, así como el motivo de la extracción del LCR.

Caracterización de las muestras de Líquido Cefalorraquídeo

Previo a la preparación de las bombas osmóticas para la administración del LCR, se realizó la caracterización en cultivos de motoneuronas corticales de los LCR-ELA, para distinguir las muestras entre LCR-ELA no citotóxico y LCR-ELA citotóxico (ANEXO 2).

Extracción y cultivo primario de motoneuronas embrionarias.

El manejo de animales de experimentación se llevó a cabo de acuerdo con la legislación estatal vigente estipulada por el Comité Ético Español (RD 53/20313) del 1 de febrero y por las directrices de la Normativa de la Unión Europea (2010/63/UE), por la que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos.

Para llevar a cabo la evaluación de la citotoxicidad de LCR se tomó como referencia el protocolo diseñado por Yáñez et al (276). Se empleó una hembra de rata Wistar (250-275 gramos), previamente anestesiada con Tiopental sódico 60 ml/kg (Tiobarbital 1 g, Braun) + Fentanilo 0,3 mg de fentanilo/kg (Fentanest 0,05 mg/ml solución inyectable, KERN PHARMA), que se hallaba entre los 19-21 días de gestación, a la cual se le realizó una laparotomía para la extracción de fetos (n=12). Estos se extrajeron uno a uno, realizándose la disección del cerebro correspondiente al área motora, ubicada en la parte anterior del encéfalo cercana a los bulbos olfatorios (FIGURA 11). Se obtuvieron segmentos finos y se mantuvieron a 4°C en una placa p6 con Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) (1X) sin calcio, sin magnesio (Gibco; Ref. 14190-144) para su conservación durante la extracción. La selección de esta zona para realizar el cultivo primario se debió a que la obtención de células de esta región es de fácil acceso y permite un mejor aislamiento.

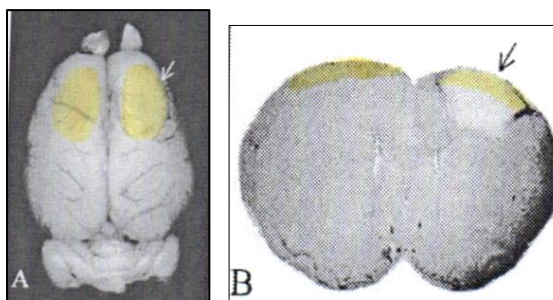


Figura 10: Imágenes de la disección de la corteza motora en embriones de rata Wistar E19-21. (A) Vista panorámica superior de cerebro de embrión E19-21 de rata. Las zonas marcadas en color amarillo y señaladas con la punta de flecha corresponden a la corteza motora que fueron diseccionadas. (B) Sección coronaria de cerebro de embrión E19-21 de rata, las zonas marcadas en color amarillo corresponden a la corteza motora, al igual que en la imagen A.

Una vez finalizada la extracción de la corteza motora, los distintos procedimientos que se describen a continuación se realizaron en una cabina de flujo laminar, con objeto de mantener la esterilidad.

Los fragmentos obtenidos se suspendieron en Neurobasal Medium (1X) sin L-glutamina (Gibco; Ref. 21103-049) y se sometieron a una digestión enzimática con 4 mg de Papaina (Thermo Scientific; Ref. 88285) en 1 ml de Earled's Balanced Salt Solution (EBSS) (1X) sin calcio, sin magnesio (Gibco; Ref. 1455-048) durante 10 minutos a 37°C. A continuación, se añadieron hasta 10 ml de Neurobasal Medium (1X) para detener la reacción enzimática y se disgregó entre 30-40 veces con una pipeta p1000 (Eppendorf Research plus; Ref. 488536Z).

Una vez parada la reacción, se centrifugó la muestra durante 4 minutos a 800 rpm, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 2 ml de Neurobasal Medium (1X) suplementado con B-27 (50X) (Gibco; Ref. A35828-01) al 2%, L- glutamina 1mM (Sigma-Aldrich; Ref. G3126) y antibiótico-antimicótico al 1% (Gibco; Ref. 15240-082).

Para poder llevar a cabo la siembra de las células, se realizó un recuento de estas en una Cámara de Neubauer, realizando una dilución de 1/2 de Trypan Blue (Sigma-Aldrich; Ref. T6146), colorante que tiñe las células muertas cuando no mantienen íntegras sus membranas, lo cual no sucede con las vivas, que se observan refringentes.

Inducción a la citotoxicidad del cultivo de motoneuronas embrionarias

Para el cultivo primario se sembró 1 placa de 96 pocillos (Corning; Ref. 3596) con una densidad de 10.000 células/pocillo y 1 placa de 24 pocillos (Thermo Scientific; Ref. 142475) con 134.000 células/pocillo, cada una destinada para un ensayo diferente que se describirá a continuación.

Una vez realizada la siembra de las placas se dejaron crecer durante 10 días en una incubadora a 37°C y CO₂ al 5%. Para mantener la capacidad de crecimiento de las células en unas condiciones óptimas, el día 5 de cultivo se realizó un cambio de medio de cultivo, añadiendo 50 µl de Neurobasal Medium (1X) suplementado.

El día 10 de cultivo se añadió a los pocillos LCR al 10% en Neurobasal Medium (1X) para su incubación a 37°C y CO₂ al 5% durante 24 horas.

A la placa p96 se le añadió LCR de pacientes con ELA, de controles y una curva patrón con diferentes concentraciones de Dimethyl Sulphoxide (DMSO) (Sigma; Ref. D2650), que se empleó para tener una curva de referencia de citotoxicidad por compuesto químico (Blanco, 0.5 mM, 1.2 mM, 2 mM, 2.5 mM, 5mM, 10mM), todos ellos con ensayos por duplicado. Esta placa fue destinada a evaluar los efectos citotóxicos del LCR sobre la población neuronal mediante el ensayo MTT.

A la placa p24 se le añadió LCR de pacientes con ELA, de controles y un blanco. Esta placa se empleó para evaluar la supervivencia de la población neuronal a través de LIVE&DEAD.

Pasadas las 24 horas de incubación, se procedió a realizar las dos técnicas de evaluación que se describirán más adelante.

Método de cuantificación de citotoxicidad: MTT

Para la evaluación de la citotoxicidad se empleó el Vybrant MTT Cell Proliferation Assay Kit (Invitrogen; Ref. V13154), que proporciona un método simple para la determinación de la viabilidad celular basado en la conversión del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) soluble en agua, en un formazán insoluble. Este formazán se solubiliza y se puede determinar la concentración por densidad óptica a 570 nm.

Previo al inicio del protocolo, se prepararon los reactivos siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. Al comienzo del ensayo se retiró el medio de cultivo y se reemplazó por 100 µl de Neurobasal Medium (1X) fresco. A continuación, se añadieron 10 µl de la solución madre MTT 12 mM a cada pocillo y se incubó a 37°C durante 4 horas. Con posterioridad a la incubación, se agregaron 50 µl de DMSO a cada pocillo para solubilizar los cristales de formazán y obtener una reacción colorimétrica; se mezclaron repetidamente con una pipeta p200 (Eppendorf Research plus; Ref. 400916Z). Una vez añadido el disolvente, la placa se incubó a 37°C durante 4 horas y posteriormente se leyó la absorbancia (Abs) a 570 nm en un espectrofotómetro para placas (Heales; Ref. MB-580). Se consideró que a partir de Abs=0,4 el LCR era No citotóxico.

Método de cuantificación de la viabilidad celular: LIVE&DEAD

Otra técnica empleada para evaluar la viabilidad celular fue LIVE/DEAD® Viability/Citotoxicity Kit (Invitrogen; Ref. MP03224). Este está basado en la determinación simultánea de células vivas y muertas con dos sondas fluorimétricas que miden parámetros de actividad esterase y la integridad de la membrana plasmática.

Las células vivas se distinguen por la presencia de la actividad esterase intracelular, determinada por la conversión enzimática no fluorescente de calceína a calceína fluorescente de color verde. Mientras que las células muertas se distinguen por el homodímero de Etidio-1, que entra en las membranas de las células dañadas, produciendo una fluorescencia roja.

Se prepararon los reactivos según el protocolo de la casa comercial, transfiriendo el reactivo Live Green al Dead Red. A continuación, se añadieron 125 µl de Neurobasal Medium (1X) y 125 µl del compuesto a cada pocillo, y se incubó durante 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Una vez acabada la incubación, se paró la reacción con PFA 4% + sacarosa 10% en PB 0'1M, para fijar el cultivo celular durante 30 minutos.

Para poder realizar la cuantificación de las células vivas y muertas, se llevó a cabo el montaje de los covers en portaobjetos con Fluorsave® (FluorSave™ Reagent, Calbiochem; Ref. 345789), posteriormente se cuantificó la cantidad de células vivas y muertas a través de un microscopio de epifluorescencia (Leica CTR4000). Se consideró que los LCR-ELA que presentaban una viabilidad del 20% o menor, correspondían a los LCR citotóxicos.

Animales

El diseño experimental se dividió en dos etapas experimentales, la primera fue una infusión ICV de LCR de pacientes de ELA en rata, para valorar si en tiempos cortos era posible establecer patrones motores, electromiográficos e histopatológicos de la ELA. Esta primera etapa se denominó Modelo Agudo.

Posteriormente, con el fin de estudiar si los líquidos ELA-No Citotóxicos, tendrían algún efecto motor, conductual, electromiográfico o histopatológico se planteó la segunda etapa en la que se incluyó un nuevo grupo y, además, se abordó la cuestión de si una infusión prolongada de LCR podría lograr efectos más acusados que el Modelo Agudo. Esta etapa se denominó Modelo Crónico.

Para el desarrollo del Modelo Agudo se utilizaron 17 ratas Wistar Han macho (Charles River Laboratories) de 8 semanas de edad y un peso comprendido entre 300 y 500g, en el momento de la implantación de las bombas osmóticas.

Posteriormente, para el desarrollo del Modelo Crónico se utilizaron 30 ratas Wistar Han macho (Charles River Laboratories) de 8 semanas de edad y un peso comprendido entre 200 y 300g, en el momento de la implantación de las bombas osmóticas.

Todos los procedimientos experimentales fueron realizados en el animalario del Hospital Clínico San Carlos, ubicado en la Unidad de Medicina y Cirugía Experimental de dicho hospital, con número de registro ES280790000088.

Los animales se mantuvieron en condiciones adecuadas de bioterio, con agua y alimento (piensos comerciales) *ad libitum*, con elementos de medio ambiental enriquecido, y condiciones ambientales de temperatura a $21\pm 1^{\circ}\text{C}$, permaneciendo en ciclos de luz/oscuridad 12:12 h.

Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con la normativa de la Comunidad Económica Europea, 2010/63/EU relativa a la protección de animales para fines científicos (Boletín Oficial de la Unión Europea, de 20 de octubre 2010, L 276/33), en vigor a nivel nacional desde febrero de 2013, a través del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero de 2013 y bajo la supervisión del Comité Local de Bioética y Bienestar Animal de nuestro hospital y de la Comunidad de Madrid. Con el número de proex: 005/17 (ANEXO 3).

Los animales del Modelo Agudo fueron asignados aleatoriamente en 2 Grupos experimentales:

- Grupo LCR-Control: 7 animales a los que se les implantó la bomba osmótica con LCR-Control.
- Grupo LCR-ELA Citotóxico: 10 animales a los que se les implantó la bomba osmótica con LCR-ELA Citotóxico.

Los animales del Modelo Crónico fueron asignados aleatoriamente en 3 Grupos experimentales:

- Grupo LCR-Control: 10 animales a los que se les implantó la bomba osmótica con LCR-Control.
- Grupo LCR-ELA No Citotóxico: 10 animales a los que se les implantó la bomba osmótica con LCR-ELA No Citotóxico.
- Grupo LCR-ELA Citotóxico: 10 animales a los que se les implantó la bomba osmótica con LCR-ELA Citotóxico.

Bombas osmóticas

Para la administración del LCR, se utilizaron bombas osmóticas (ALZET® Osmotic Pumps, Charles River Laboratories). El mecanismo de acción de estas bombas se produce debido a la diferencia de presión osmótica que existe entre la capa osmótica (FIGURA 12) de la bomba y el tejido donde se implanta. La capa osmótica presenta una alta osmolaridad, esto es indispensable para que el agua fluya hacia la bomba a través de una membrana semipermeable (FIGURA 12) que se encuentra localizada en el exterior de la bomba. Cuando el agua penetra, la capa osmótica comprime el reservorio (FIGURA 12), provocando que el LCR se desplace hacia el moderador de flujo, que permite la administración controlada y constante del LCR (277).

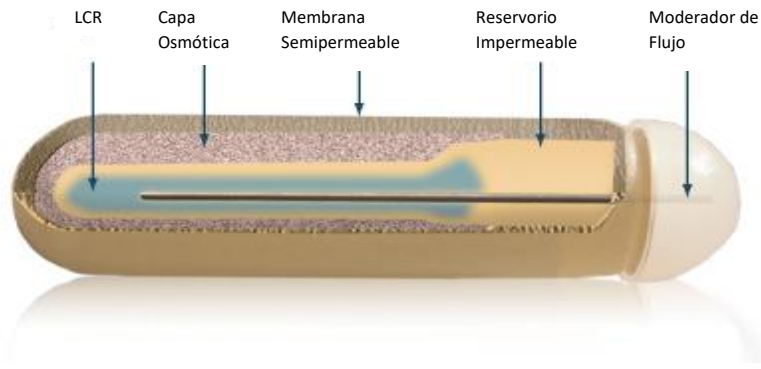


Figura 11: Esquema de las capas de la bomba osmótica. Modificado de (276).

La gran mayoría de los fármacos no son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE), es por ello que se hace necesaria la administración local directamente dentro del SNC. Para ello, a las bombas osmóticas se les puede unir un ALZET Brain Infusion Kit® (FIGURA 13) que permite la administración directa en el cerebro del LCR (278).

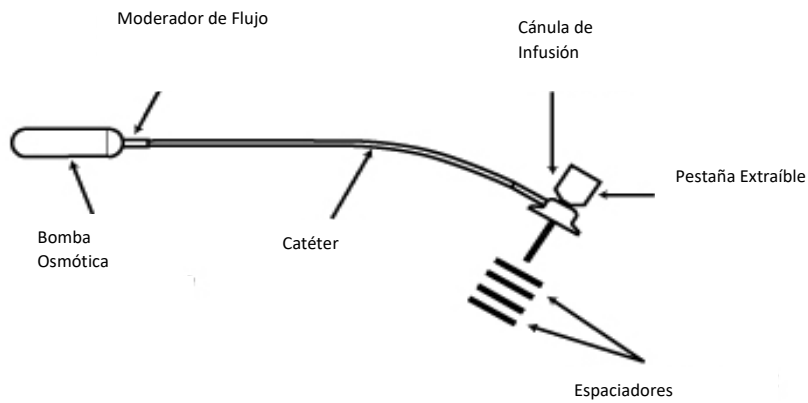


Figura 12: Esquema de las partes del ALZET Brain Infusion Kit®. Modificado de (277).

En este proyecto se utilizaron bombas osmóticas del modelo 1002 para el Modelo Agudo y del modelo 2002 para el Crónico, junto con el ALZET Brain Infusion Kit® modelo 3. El modelo 1002 proporciona un flujo continuo de LCR con una velocidad de 0.25µl/hora durante 14 días, mientras que el modelo de bomba 2002 posibilita un flujo continuo y controlado de LCR a una velocidad de 0.5µl/hora durante 14 días. En el Modelo Crónico se aplicaron tres bombas osmóticas de forma consecutiva a cada animal (1ª: día 1 al 14; 2ª: día 15 al 28; 3ª: día 29 al 42.).

Cada bomba se rellenó con un volumen de 100 µl de un *pool* de LCR-Control y LCR-ELA Citotóxico respectivamente en el Modelo Agudo (TABLA 8), y con un volumen de 200 µl de un *pool* de LCR-Control, LCR-ELA No Citotóxico y LCR-ELA Citotóxico respectivamente (TABLA 9), en el Modelo Crónico, tras lo cual se procedió a unir el Brain Infusion Kit® a la bomba mediante un catéter lo suficientemente largo para permitir la movilidad de la cabeza y el cuello del animal una vez insertada la bomba dentro de este, en el espacio supraescapular entre la capa muscular y la dermis. Este catéter también estaba lleno del LCR correspondiente. El catéter se fija tanto a la bomba como al Brain Infusion Kit® mediante pegamento instantáneo de cianoacrilato (Loctite®).

ID muestra Control	ID muestra Citotóxico
HC22	1
	4
	13
	14
	17
	19
	HC 120
	HC 130
	HC 137
	HC 138
	HC 141
	HC 143
	HC 149
	HC150
	HC 152
	HC 154
	HC 175

Tabla 8: Clasificación de las muestras utilizadas en el Modelo Agudo divididas por tipo de LCR.

ID muestra Control	ID muestra No Citotóxico	ID muestra Citotóxico
HC 25	HC 144	HC 130
HC 28	HC 148	HC 137
	HC 156	HC 138
	HC 157	HC 141
	HC 158	HC 143
		HC 149
		HC 150
		HC 152
		HC 154
		HC 175

Tabla 9: Clasificación de las muestras utilizadas en el Modelo Crónico divididas por tipo de LCR.

Cirugía

El procedimiento quirúrgico para la implantación de la bomba osmótica fue igual en ambos modelos y el protocolo a seguir fue el siguiente:

El animal era anestesiado vía intraperitoneal con 75 mg/kg de ketamina (Ketolar 50mg/ml, PARKE-DAVIS, Grupo Pfizer) y 0,25 mg/kg de medetomidina (Domtor 1mg/ml, ecuphar®) y durante todo el procedimiento, se mantuvo con anestesia gaseosa de isoflurano al 2% (Aerrane 100%; Ref. 607114.4 0H, Baxter), con un flujo de oxígeno de 4 litros.

Tras la comprobación de que el animal estaba totalmente anestesiado, se procedió a rasurar la zona de interés y, posteriormente, a colocarlo en el estereotáxico (NEUROSTAR StereoDrive; Serial N°: 02008CFF00BD), tras lo cual se le aplicó gel lubricante en los ojos (Lubrithal, Dechra).

Con un bisturí, se realizó una incisión sagital de 2,5 cm de longitud para exponer el cráneo del animal. Con un hisopo se limpiaba el exceso de sangre. Con el bisturí se retiraba el tejido conectivo adherido al cráneo para limpiar la zona del hueso parietal y mejorar así la posterior adhesión del Brain Infusion Kit®. Una vez limpio, se procedía a realizar una apertura subcutánea en el área interescapular donde se colocaría la bomba. Tras esto, se localizaban Bregma y Lambda (FIGURA 14), que serían utilizados como referencia para la localización del trépano.

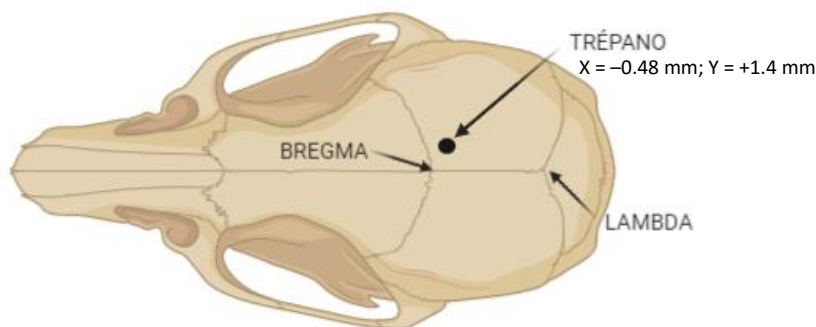


Figura 13: Representación del cráneo de una rata. Se indican las marcas de referencia Bregma y Lambda, así como el sitio de trepanación con sus coordenadas. Realizado con <https://app.biorender.com/>.

Mediante coordenadas estereotáxicas ($X = -0.48$ mm; $Y = +1.4$ mm), se determinó la localización donde realizar el trépano (FIGURA 15) y se procedió a realizar dicho trépano con un taladro provisto de una punta de diamante, teniendo cuidado de no penetrar la duramadre (FIGURA 15). La cánula del Brain Infusion Kit® se sujetaba al estereotáxico y se insertaba mediante coordenadas estereotáxicas ($X = -0.48$ mm; $Y = +1.4$ mm; $Z = +4.0$ mm) (FIGURA 15). Para fijar la cánula al cráneo se utilizaba una gota de pegamento instantáneo de cianoacrilato (Loctite®) y cemento dental (Henry Schein®; Ref. 100-1673) con la finalidad de formar una plataforma estable entre el hueso temporal y el soporte de la bomba de infusión. Una vez seco, el catéter y la bomba se introducían en la apertura interescapular que se había realizado anteriormente. Tras esto se procedía a cerrar la incisión con sutura absorbible (Vycril™ 3-0, Ethicon; Ref. V316H).

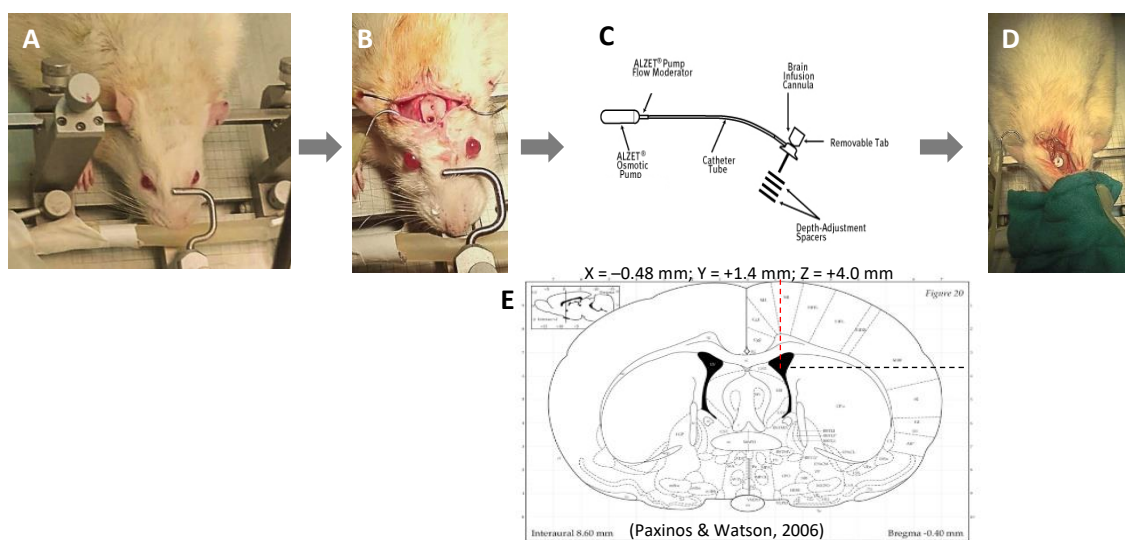


Figura 14: Esquema de la implantación de la bomba osmótica en el ventrículo lateral derecho de la rata. A. Colocación del animal en el estereotáxico. B. Incisión en la calota y trépano. C. esquema del Brain Infusion Kit®. D. Ilustración de la bomba osmótica una vez insertada. E. Esquema de la localización de la bomba osmótica mediante coordenadas estereotáxicas.

Al terminar el procedimiento quirúrgico, se administró vía subcutánea 0,2 mg/kg de Meloxicam (Metacam 5mg/ml, Boehringer Ingelheim), y 15 mg/kg de Enrofloxacin (Baytil 25mg/ml, BAYER) como antiinflamatorio y antibiótico respectivamente, además de 1 mg/kg de Atipamezol (Antisedan 5mg/ml, Ecuphar®) como revertidor de la anestesia.

A los animales se les administró antiinflamatorio y antibiótico, diariamente, en los tres días post cirugía, así mismo, los animales fueron monitorizados diariamente hasta que la sutura cicatrizó. Posteriormente se monitorizaron semanalmente controlando a su vez el peso corporal con una balanza digital (LETICA DIGITAL SCALE LE-2000).

Electromiografía

El reflejo de Hoffman se utiliza para estudiar las características de las conexiones monosinápticas desde las fibras sensoriales hasta las motoneuronas espinales.

El EMG se realiza en ambas extremidades traseras. Para ello, el animal es anestesiado con Isoflurano al 4% (Aerrane 100%; Ref. 607114.4 OH, Baxter) y esta anestesia es mantenida al 1,5-2% durante todo el procedimiento. Una vez anestesiado, el animal fue colocado en la mesa de cirugía decúbito prono, dejándole libres las extremidades posteriores donde se realizaría el procedimiento. Se utilizaron 5 electrodos, dos de estimulación y 3 de registro. Los electrodos de estimulación se colocaron subcutáneamente, paralelos a ambos lados del espacio retromaleolar, circulando la corriente eléctrica en sentido lateromedial, mientras que los 3 electrodos de registro se colocaron, el positivo en el segundo espacio interóseo plantar, el electrodo de referencia en el borde plantar lateral, y la toma de tierra se colocó en el tercio superior de la cola (FIGURA 16) (279). Los electrodos se fijaron a la mesa para imposibilitar su desplazamiento durante el proceso.

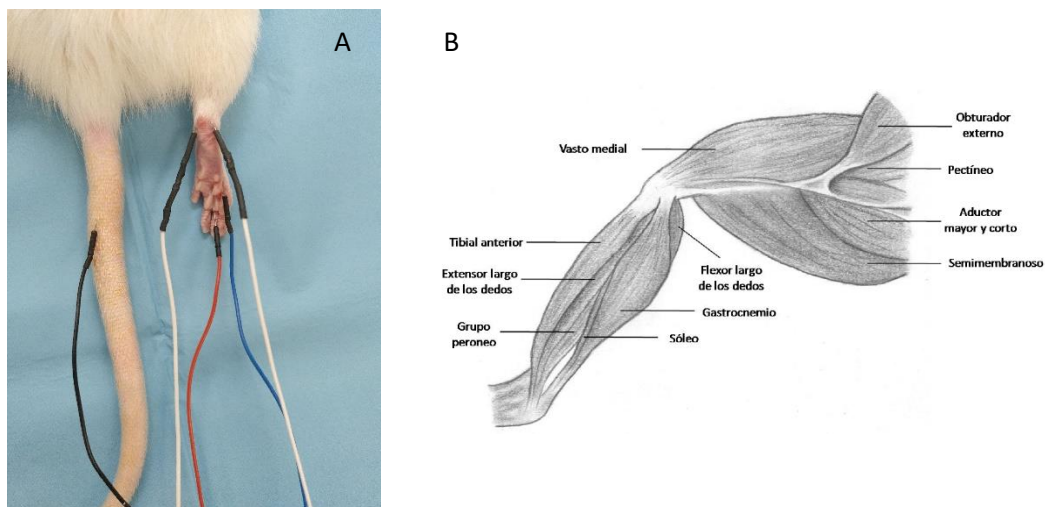


Figura 15: A: Localización de los electrodos de estimulación y registro. En blanco se muestran los electrodos de estimulación localizados a ambos lados del tendón de Aquiles, en rojo el electrodo de registro positivo localizado entre la segunda y tercera almohadilla, en azul el electrodo de registro negativo, localizado en el lateral del quinto dedo, por último, en color negro el electrodo tierra localizado en el tercio superior de la cola. B: Músculos internos de la extremidad posterior de rata (vista medial). Tomado de *Elaboración de Esquemas Anatómicos de las extremidades inferiores de la rata mediante una técnica de dibujo a lápiz*.

Para la estimulación eléctrica se utilizó un estimulador analógico (FIGURA 17) (Grass Telefactor W. Warwick, RI U.S.A modelo S88) al cual se le asocia una unidad de aislamiento de estímulos (SIU) modelo PSIU6 (FIGURA 18) (Grass Instrument Co USA) que permite el control de las intensidades de estimulación, así como su polaridad. Una vez que el estímulo se produce, los electrodos de registro envían la respuesta a un amplificador AC/DC modelo 3000 (FIGURA 19) (A-M Systems™) que amplificará la señal y, seguidamente, la envía a una interfaz de registro (FIGURA 20) (CED1401), asociada a una CPU (Unidad central de procesamiento) donde el software Spike v8.04 (Cambridge Electronic Design Limited) permite la visualización y análisis de los datos registrados.



Figura 16: Estimulador Grass modelo S88. En la parte superior se indican las condiciones de estimulación en el protocolo de Intensidades: Rate 0.2Hz, Delay 0, Duration 0.5ms y Volts 7mA (Variable).



Figura 17: Unidad de Aislamiento PSIU6. Permite modificar la intensidad del pulso proporcionado, así como cambiar su polaridad. Concretamente en la imagen está programada para dar pulsos entre 1 y 15mA y polaridad normal.



Figura 18: Amplificador AC/DC modelo 3000. Permite amplificar la señal obtenida por los pulsos eléctricos dados.



Figura 19: Tarjeta analógico/digital. Permite convertir la información analógica registrada en información digital que se verá reflejada en el software Spike.

EMG Modelo Agudo

Los registros EMG se realizaron a los 7 animales del Grupo LCR-Control y a los 10 animales del Grupo LCR-ELA Citotóxico, llevando a cabo dos protocolos de EMG: un protocolo de intensidades (mA) y un protocolo de frecuencias (Hz). Ambos protocolos se realizaron previos a la implantación de las mini bombas osmóticas y posteriormente a la cirugía a días 3, 7, 14, 21 y 28.

- El protocolo de intensidades consiste en fijar la frecuencia con la que se realizan los estímulos eléctricos a 0,2Hz y aumentar progresivamente la intensidad de dichos estímulos desde 0,1mA hasta 10mA. Concretamente, se dieron un mínimo de 5 pulsos en cada una de las siguientes intensidades: 0.1; 0.3; 0.5; 0.7; 0.9; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9 y 10 mA.

- El protocolo de frecuencias consiste en fijar la intensidad y aumentar la frecuencia progresivamente desde 0,2Hz hasta 10Hz. Se considera que la intensidad fijada debe ser aquella intensidad a la que las ondas M y H se estabilizaron en el protocolo de intensidades. En concreto se dieron un mínimo de 5 pulsos en cada una de las siguientes frecuencias: 0.2; 0.5; 1; 2; 4; 6; 8; y 10 Hz.

EMG Modelo Crónico

Los registros EMG se realizaron a 5 animales del Grupo LCR-Control, 4 animales del Grupo LCR-ELA No Citotóxico y a 6 animales del Grupo LCR-ELA Citotóxico; llevando a cabo dos protocolos de EMG: un protocolo de intensidades (mA) y un protocolo de frecuencias (Hz). Ambos protocolos se realizaron previos a la implantación de las minibombas osmóticas y posteriormente a la cirugía a días 3, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 y 56.

- El protocolo de intensidades consiste en fijar la frecuencia con la que se realizan los estímulos eléctricos a 0,2Hz y aumentar progresivamente la intensidad de dichos estímulos desde 0,1mA hasta 10mA. Concretamente, se dieron un mínimo de 5 pulsos en cada una de las siguientes intensidades: 0.1; 0.3; 0.5; 0.7; 0.9; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9 y 10 mA.
- El protocolo de frecuencias consiste en fijar la intensidad y aumentar la frecuencia progresivamente desde 0,2Hz hasta 10Hz. Se considera que la intensidad fijada debe ser aquella intensidad a la que las ondas M y H se estabilizaron en el protocolo de intensidades. En concreto se dieron un mínimo de 5 pulsos en cada una de las siguientes frecuencias: 0.2; 0.5; 1; 2; 4; 6; 8; y 10 Hz.

Pruebas Conductuales

Tras evaluar los resultados del Modelo Agudo, se consideró relevante realizar estudios conductuales para evaluar la función motora de forma cuantitativa de los animales del Modelo Crónico. Concretamente los animales fueron sometidos a la escala motora Matsumoto, Plano Inclinado y Footprint Test.

Estas pruebas conductuales se realizaron a 6 animales del Grupo LCR-Control, 6 animales del Grupo LCR-ELA No Citotóxico y a 6 animales del Grupo LCR-ELA Citotóxico.

Matsumoto

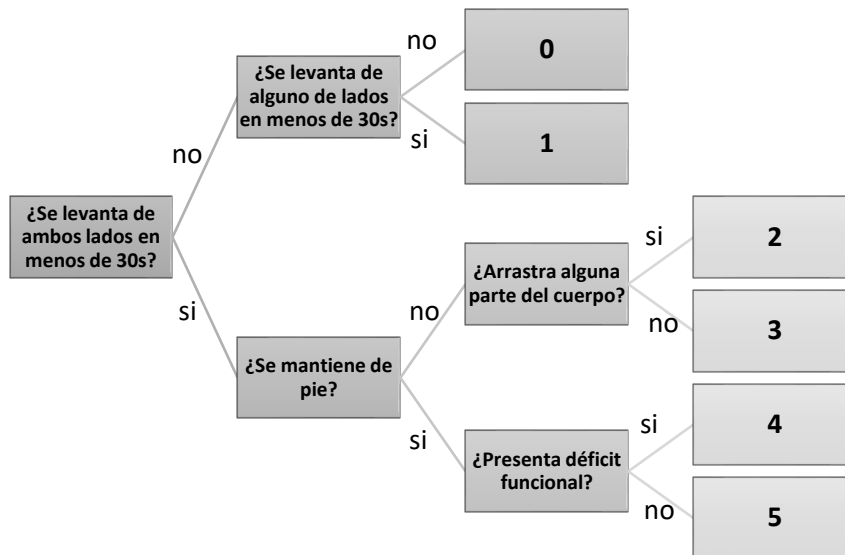
La escala motora Matsumoto (280) es una prueba conductual que permite estudiar la función motora. Esta escala fue desarrollada para evaluar el fenotipo motor de ratas SOD1-G93A, en cualquier estadio de la enfermedad.

El protocolo de Matsumoto (ESQUEMA 1) a seguir es el siguiente: el animal es colocado en un campo abierto y se observa durante 30 segundos si es capaz de incorporarse de ambos lados. Si en estos 30 segundos el animal no se incorpora, se le da una puntuación de 0, si solo es capaz de levantarse de un lado, se le da una puntuación de 1.

Posteriormente se estudia si son capaces de mantenerse de pie. En aquellos animales que no son capaces de mantenerse de pie se observa si arrastran alguna parte del cuerpo. Si arrastran alguna parte del cuerpo, se le da una puntuación de 2, si por el contrario esto no sucede y no arrastran ninguna parte del cuerpo, se les da una puntuación de 3.

Por otro lado, en aquellos animales que sí eran capaces de mantenerse de pie en el campo abierto, se observa si presentaban algún déficit funcional como podría ser parálisis de las extremidades o algún signo de debilidad muscular. Si presentan alguno de estos déficits, se les da una puntuación de 4, si por el contrario no presentaban déficits funcionales, se les proporciona la puntuación de 5.

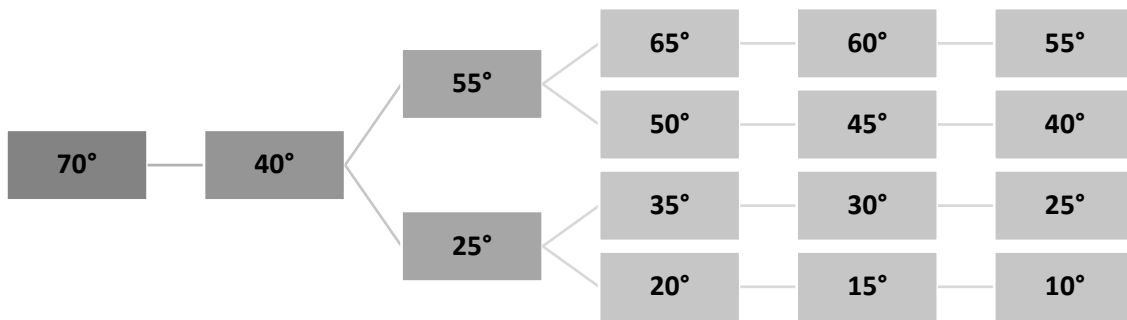
La disminución en los valores obtenidos en el test se correlaciona con un incremento de los síntomas en cualquiera de los fenotipos de la enfermedad.



Esquema 2: Diagrama de flujo a seguir en la escala Matsumoto. Adaptado de (279).

Plano Inclinado

Esta prueba conductual permite determinar la fuerza en las extremidades de los animales. En un primer momento se utilizaba para animales que presentaban lesión en la médula espinal (280, 281). Los animales fueron colocados lateralmente de forma perpendicular al eje mayor del plano inclinado, y se evaluó el ángulo máximo al cual son capaces de mantenerse durante 5 segundos sin caerse. Este proceso se realiza colocando al animal tanto del lado derecho como del izquierdo, para así evaluar la fuerza en ambas extremidades. El algoritmo seguido se muestra en la ESQUEMA 2. Se tomó como partida el ángulo de 70 grados debido a que se ha correlacionado que, por debajo de este ángulo, los animales SOD-G93A ya mostraban debilidad muscular y pérdida de fuerza.



Esquema 3: Algoritmo a seguir para el protocolo de Plano Inclinado. Adaptado de (279).

Footprint Test

El análisis de las pisadas mientras que los animales andan libremente, permite el estudio de la coordinación motora, así como la sincronía. Para realizar esta prueba conductual, las patas de los animales se tiñen con tinta no tóxica. Las patas delanteras se tiñen de negro y las traseras de azul para poder diferenciarlas con facilidad posteriormente. Tras teñir las patas, se coloca el animal para que ande sobre una camino estrecho y recto, para evitar que los animales se den la vuelta. Sobre este camino se coloca un papel absorbente donde quedaran marcadas las huellas (FIGURA 21).



Figura 20: Representación gráfica del Footprint Test. En negro se muestran las patas delanteras y en azul las patas traseras.

Posteriormente, se analizan 4 variables siguiendo el protocolo de Medinaceli et al (282) (FIGURA 22). Se toman como control la extremidad derecha, debido a que es la contralateral al hemisferio de implantación de la bomba osmótica:

Distancia al pie opuesto (**TOF**): es la proyección ortogonal de la distancia desde punta de una extremidad a la punta de la extremidad opuesta. NTOF representa la distancia desde la extremidad control a la extremidad experimental, mientras que ETOF representa la distancia desde la extremidad experimental a la extremidad control.

Largo de la huella (**PL**): es la distancia lineal entre el talón y el tercer dedo. NPL representa esta distancia en las extremidades controles mientras que EPL representa la distancia en la extremidad experimental.

Distancia entre el primer y el quinto dedo (**TS**): representa la distancia lineal entre el centro de la huella del primer dedo y el centro de la huella del quinto dedo. NTS representa la pata control mientras que ETS la extremidad experimental.

Distancia entre los dedos intermedios (**IT**): representa la distancia lineal entre el centro de la huella del segundo dedo y el centro de la huella del cuarto dedo. NIT representa la pata control mientras que EIT, la extremidad experimental.

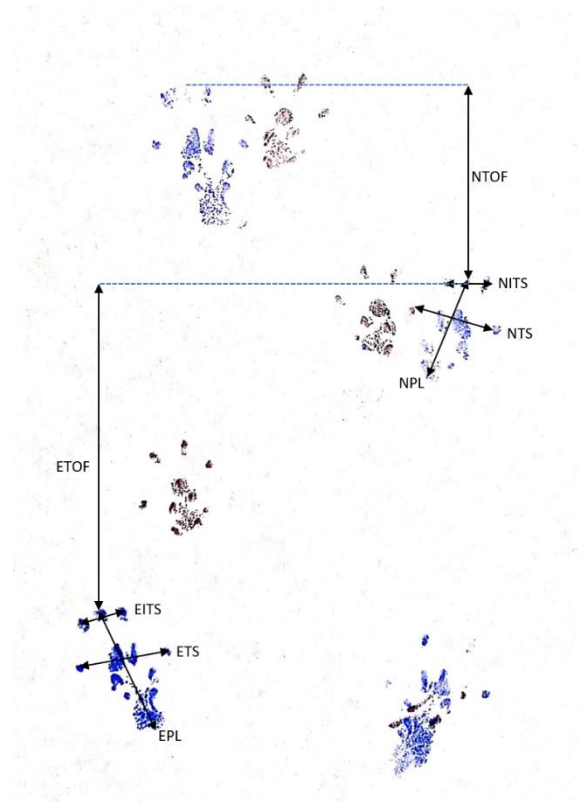


Figura 21: Representación gráfica de las variables a analizar en el Footprint Test. En negro se muestran las patas delanteras y en azul las patas traseras. Se indican las variables a medir tanto en la extremidad control (N) como en la experimental (E).

Para calcular el grado de daño motor se utiliza el índice funcional del ciático (SFI) mediante la siguiente fórmula:

$$SFI = \frac{ETOF - NTOF}{NTOF} + \frac{NPL - EPL}{EPL} + \frac{ETS - NTS}{NTS} + \frac{EIT - NIT}{NIT} \times \frac{220}{4}$$

Perfusión Intracardiaca

Para evaluar los cambios neuropatológicos, se procede al sacrificio de los animales mediante perfusión intracardiaca con formaldehído al 4% (Casa Álvarez; Ref. FO090101.1221.). Se realiza aproximadamente a día 40 tras la implantación de las bombas osmóticas en el Modelo Agudo, y a día 59 tras la implantación de las bombas osmóticas en el Modelo Crónico.

El animal es anestesiado con tiopental 40-60 mg/kg (Tiobarbital Braun 1 g) y fentanilo 0.3mg/kg (Fentanest 0,05 mg/ml solución inyectable, KERN PHARMA) vía intraperitoneal. Una vez alcanzado el plano quirúrgico (ausencia de reflejo podal), el animal se coloca sobre una rejilla, adecuada para la recogida de los líquidos de lavado y fijación, y se estiran y sujetan las extremidades. Posteriormente, se realiza un corte en la piel a la altura del final del esternón; se separa la piel y se cortan las costillas en paralelo a los pulmones para exponer el corazón. Tras esto, se inserta una aguja en el ventrículo izquierdo hasta alcanzar la aorta y, a continuación, se realiza una incisión en la aurícula derecha para permitir el escape de la circulación de retorno de los líquidos. En ese momento, con una bomba peristáltica (Fisher Scientific; Ref. GP1100) se procede al lavado de los tejidos con solución salina 0,9% a una velocidad de 40 ml/min (300-400 ml) (GRIFOLS; Ref. 605137). Finalmente se procede a la fijación de los tejidos mediante solución de fijado con formaldehído al 4% (300-400 ml).

El sacrificio de los animales se llevó a cabo de acuerdo con la normativa de la Comunidad Económica Europea, 2010/63/EU relativa a la protección de animales para fines científicos (Boletín Oficial de la Unión Europea, de 20 de octubre 2010, L 276/33), en vigor a nivel nacional desde febrero de 2013, a través del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero de 2013.

Extracción y procesado de tejidos

Tras finalizar el procedimiento de perfusión intracardiaca, se procedió a la extracción de los tejidos de interés (FIGURA 23).

Para la extracción del cerebro, se procede a decapitar el animal a la altura del tronco cerebral. Posteriormente se retira toda la piel y musculatura adyacente y se expone el cráneo del animal, extrayendo posteriormente la bomba implantada. Con ayuda de unas pinzas no dentadas y de unas tijeras de punta curva se procede a la apertura del cráneo y exposición del cerebro. Con sumo cuidado se extrae el tejido, previa eliminación de las meninges, para evitar cortes en el mismo y se sumerge la solución de post fijación (formaldehído 4%) durante 24 horas.

Para la obtención del tejido de la médula espinal, se extrae la columna vertebral completa y se mantiene en solución de post fijación (formaldehído 4%) durante una semana. Transcurrido ese tiempo, se procede a extraer la médula espinal, para ello se retira toda la musculatura adyacente y se procede a la apertura de toda la columna con el fin de exponer la médula. La médula se extrae y se retiran las meninges, sumergiendo de nuevo el tejido en solución de post fijación (formaldehído 4%) durante 24 horas.

Pasado el tiempo correspondiente, los tejidos son lavados *con phosphate buffered saline* (PBS) y transferidos a una solución crioprotectora de sacarosa 30% en PBS, para deshidratarlos y evitar la formación de cristales durante la posterior congelación. La solución de criopreservación se cambia una o dos veces por semana, realizando al menos 3 cambios.

A continuación, el tejido extraído se incluye en medio NEG-50™ (Thermo Fisher Scientific/Richard-Allan Scientific 6502) u OCT (Optimal Cutting Temperature) y se mantiene a -20°C hasta que el medio se solidifique. Una vez solidificado, se realizan secciones coronales de 30µm de las regiones de corteza motora en cerebro y C5-C6/L3-L5 de médula espinal, utilizando el criostato (Microm HM505E). Los cortes fueron realizados de forma seriada y fueron seguidamente colocados en un portaobjetos (Leica 3800200AE) y conservados a -20°C hasta su uso para las técnicas inmunohistoquímicas.

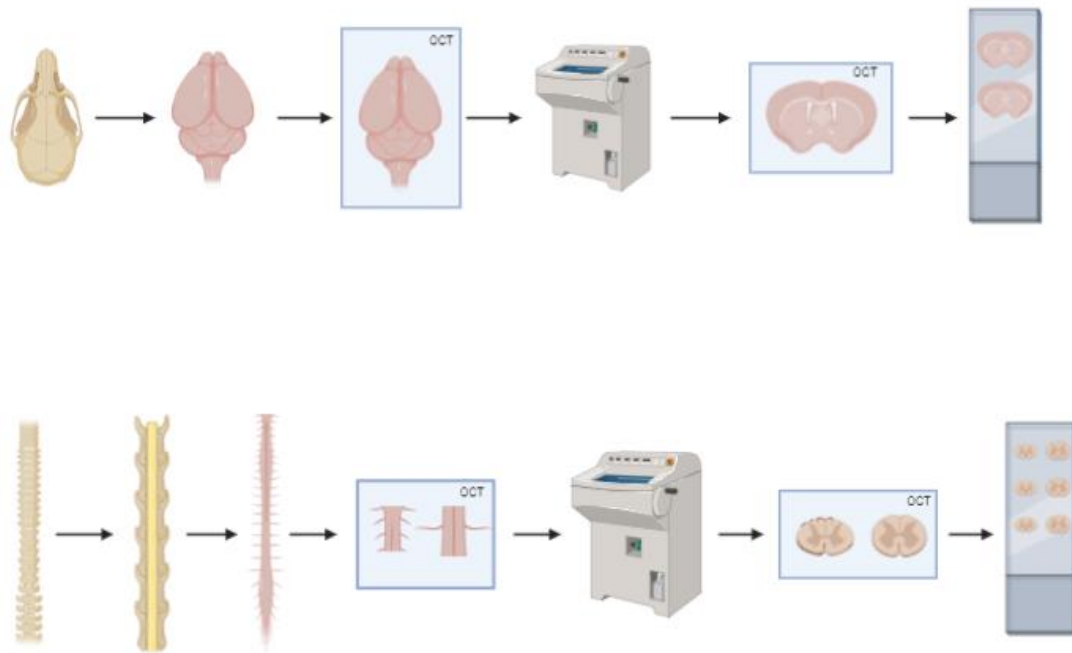


Figura 22: Esquema del procedimiento de extracción y procesado de tejidos. A. Extracción y procesado del cerebro: Se realiza la apertura del cráneo, se extrae el cerebro, se transfiere a solución crioprotección, se incluye en medio de inclusión NEG-50, se realizan cortes coronales a criostato y se colocan los cortes en portaobjetos (2 cortes por porta). B. Extracción y procesado de la médula espinal: Se realiza la apertura de la columna vertebral, se extrae la médula espinal, se transfiere a solución crioprotección, se realizan secciones de las zonas de interés (médula cervical y lumbar), se incluye en medio de inclusión NEG-50, se realizan cortes coronales a criostato y se colocan los cortes en portaobjetos (3 cortes por porta).

Inmunohistoquímica

Para evaluar histopatológicamente los cambios producidos por el LCR, se realizaron inmunohistoquímicas de fluorescencia para su posterior análisis mediante microscopia confocal.

Previo al inicio del protocolo de inmunohistoquímica, el primer paso fue el lavado de los tejidos con PBS 1X, realizando al menos 4 lavados con agitación suave en una placa de movimiento orbital, ayudando con esto a eliminar el exceso de OCT y de sacarosa presentes en los tejidos, favoreciendo con así la penetración de los anticuerpos.

El procedimiento fue el siguiente: los tejidos se dejaron atemperar y fueron colocados en cámaras húmedas. Posteriormente se lavaron 3 veces con PBS 1X (PBS 10X Canvax; Ref. BR0004) durante 5 minutos (3x5min), tras esto se permeabilizaron con PTA (PBS 1X + Tritón x-100 al 0.1% (Sigma Aldrich; Ref. T9284) + 0.01% albúmina bovina (Sigma-Aldrich; Ref. A3733) (3x5min) y posteriormente se bloquearon los epítomos inespecíficos, mediante suero de burro al 3% en PTA, durante una hora y media a temperatura ambiente. Seguidamente se incubaron los tejidos con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo *overnight* a temperatura ambiente.

Los anticuerpos primarios utilizados para el Modelo Agudo fueron los siguientes (TABLA 10):

- **GFAP** (Proteína ácida fibrilar glial): es una proteína de los filamentos intermedios que actúa como un componente estructural intracelular del citoesqueleto de los astrocitos. Su expresión se ve incrementada con la activación de este tipo celular.
- **IBA1** (Molécula adaptadora 1 de unión a calcio ionizado): es una proteína de unión a actina citosólica que contiene un dominio de unión a calcio específico de las células de microglía y ve aumentada su expresión con la activación de estas.
- **ChAT** (Acetilcolintransferasa): es una enzima que cataliza la biosíntesis de la acetilcolina, un neurotransmisor que regula la señal de transducción en la unión neuromuscular. Se encuentra exclusivamente en las neuronas colinérgicas del cerebro y la médula espinal. En la ELA se ha observado una disminución en los niveles de ChAT.
- **TDP43**: es una proteína que pertenece a la familia de las ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas y es crítica para la supervivencia de las células nerviosas. Normalmente está localizada en el núcleo de las células nerviosas y gliales. Cuando existe una patología, esta proteína transloca al citosol y se producen acumulaciones que se manifiestan en forma de inclusiones citoplasmáticas.

- **Ubiquitina:** es una proteína pequeña que participa en el proceso de ubiquitinación, el cual controla la degradación proteica, así como la estabilidad y la localización intracelular de las muchas proteínas. En ELA las inclusiones citoplasmáticas de las motoneuronas son ricas en ubiquitina.
- **NeuN:** es una proteína localizada en el núcleo y en el citoplasma perinuclear de neuronas del SNC de mamíferos. Es un marcador ampliamente utilizado en la diferenciación neuronal para evaluar el estado de las neuronas, tanto en situaciones fisiológicas como patológicas, ya que es específico de este tipo celular. Diversas patologías provocan una disminución de la inmunorreactividad de NeuN.

Anticuerpo Primario	Casa Comercial	Referencia	Inmunógeno	Especie	Dilución
GFAP	Biolegend	829401	GFAP nativo purificado de médula espinal bovina	<i>Chicken</i>	1:1000
IBA 1	Abcam	ab5076	Iba1 Humana, aa 135-147 (C- terminal)	<i>Goat</i>	1:500
ChAT	Millipore	AB144P	Enzima Humana placentaria	<i>Goat</i>	1:150
TDP43	Abcam	ab57105	TDP43 Humana completa recombinante, aa 1-261	<i>Mouse</i>	1:250
Ubiquitina	Abcam	ab7780	Ubiquitina Humana completa recombinante	<i>Rabbit</i>	1:100
NeuN	Millipore	MAB377	Núcleos celulares purificados de cerebro de ratón, clon A60	<i>Mouse</i>	1:500

Tabla 10: Anticuerpos primarios utilizados en el Modelo Agudo. Se indica el nombre del anticuerpo, la casa comercial, su referencia, inmunógeno, la especie donde se han realizado y la dilución de uso.

Los anticuerpos primarios utilizados para el Modelo Crónico fueron los siguientes (TABLA 11):

- **GFAP**
- **IBA1**
- **ChAT**
- **TDP43**
- **Ubiquitina**
- **NF** (Neurofilamentos): filamento intermedio presente en el citoplasma de las neuronas. Interviene en el mantenimiento de la estructura neuronal y en el transporte axonal. En la ELA se aumentan los niveles en el soma y el axón proximal, llegando a formar precipitados.
- **Caspasa 3**: es una proteasa que participa en la muerte celular y es uno de los principales efectores de la cascada de apoptosis, tanto en la vía intrínseca como en la extrínseca. La activación de esta caspasa se observa incluso antes del inicio de la debilidad muscular.
- **CD86**: es una glicoproteína transmembrana que participa en los estadios iniciales de la activación de las células T. En el modelo SOD1-G93A aumentan los niveles de CD86 al presentar la microglía el fenotipo proinflamatorio M1.
- **Arg1** (Arginasa 1): es una enzima citosólica dependiente de manganeso que participa en el metabolismo de la arginina, contribuyendo a la reparación de tejidos. Presenta propiedades neuroprotectoras, siendo esencial para proteger las motoneuronas del óxido nítrico dependiente de la apoptosis. Se induce cuando la microglía presenta un fenotipo M2.
- **MHC II** (Complejo Mayor de Histocompatibilidad 2): glicoproteína de membrana de las células presentadoras de antígenos. Interviene en el desarrollo de las respuestas inmunes específicas tanto humoral como celular, participando en el reconocimiento de los antígenos por los linfocitos T. En los tejidos afectados por la ELA se ha visto que existe un aumento de los niveles de MHC II. También es considerado como un marcador de la fase de polarización M1.

Anticuerpo Primario	Casa Comercial	Referencia	Inmunógeno	Especie	Dilución
GFAP	Origene	AP31806PU-N	GFAP humana recombinante	<i>Chicken</i>	1:300 (cerebro) 1:500 (médula)
IBA 1	Abcam	ab5076	Iba1 Humana, aa 135-147 (C-terminal)	<i>Goat</i>	1:500
NF	Biologend	841001	Extremo C-terminal de NF-M de rata	<i>Rabbit</i>	1:500
ChAT	Millipore	AB144P	Enzima humana placentaria	<i>Goat</i>	1:150
Caspasa 3	Sigma Aldrich	C8487	Péptido sintético correspondiente al sitio de corte de la caspasa 3 humana conjugada a KLH	<i>Rabbit</i>	1:300
TDP43	Abcam	ab57105	TDP43 humana completa recombinante, aa 1-261	<i>Mouse</i>	1:250
CD86	Finetest	FNab01504	Molécula CD86	<i>Rabbit</i>	1:320
Arg 1	Finetest	FNab04801	Arginasa	<i>Mouse</i>	1:500
Ubiquitina	Biologend	646302	Complejo de ubiquitina IgG entrecruzado con glutaraldehído desnaturalizado	<i>Mouse</i>	1:100
MHC II	Abcam	Ab180779	Fragmento recombinante de MHCII humana, aa 30-225, dominio extracelular	<i>Rabbit</i>	1:174,6

Tabla 11: Anticuerpos primarios utilizados en el Modelo Crónico. Se indica el nombre del anticuerpo, la casa comercial, su referencia, inmunógeno, la especie donde se han realizado y la dilución de uso.

Al día siguiente, se lavan los tejidos con PTA (3x5min) para eliminar posibles restos de anticuerpo no unido y posteriormente son incubados con el anticuerpo secundario correspondiente (TABLA 12 y TABLA 13) diluido en solución de bloqueo, durante 2 horas a temperatura ambiente y oscuridad. Además del anticuerpo secundario correspondiente, se añade DAPI (diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol) y Draq5 para la tinción de núcleos.

Anticuerpo Secundario	Fluorocromo	Casa Comercial	Referencia	Dilución
Donkey Anti-Chicken	Alexa Fluor 488	Abcam	ab63507	1:500
Donkey Anti-Goat	Alexa Fluor 488	Invitrogen	A11055	1-10 ug/ml
Donkey Anti-Goat	Alexa Fluor 555	Abcam	ab150130	1:500
Donkey Anti-Rabbit	Alexa Fluor 555	Invitrogen	A31572	1-10 ug/ml
DAPI		Biologend	422801	1:2000
Draq5		Abcam	ab108410	1:4000

Tabla 12: Anticuerpos secundarios utilizados en el Modelo Agudo. Se indica el nombre del anticuerpo, el fluorocromo conjugado, la casa comercial, su referencia y la dilución de uso.

Anticuerpo Secundario	Fluorocromo	Casa Comercial	Referencia	Dilución
Donkey Anti-Chicken	Alexa Fluor 488	Abcam	ab63507	1:500
Donkey Anti-Goat	Alexa Fluor 488	Abcam	ab150129	1:500
Donkey Anti-Goat	Alexa Fluor 555	Abcam	ab150130	1:500
Donkey Anti-Rabbit	Alexa Fluor 555	Abcam	ab7080	1:400
Donkey Anti-Mouse	Cy3	Jackson ImmunoResearch	715-165-150	1:400
Donkey Anti-Mouse	Alexa Fluor 647	Abcam	ab150107	1:400
Donkey Anti-Rabbit	Cy5	Jackson ImmunoResearch	711-175-152	1:300
DAPI		Biologend	422801	1:2000
Draq5		Abcam	ab108410	1:4000

Tabla 13: : Anticuerpos secundarios utilizados en el Modelo Crónico. Se indica el nombre del anticuerpo, el fluorocromo conjugado, la casa comercial, su referencia y la dilución de uso.

Transcurrida la incubación, se retira el anticuerpo secundario y se lava con PBS (3x5min). Seguidamente, se dejan secar los portaobjetos y se montan con un cubreobjetos y medio de montaje acuoso FLUORSAVE (Millipore 345789) adecuado para preservar la fluorescencia.

Adquisición y análisis de imágenes

Para visualizar y posteriormente analizar los resultados de las inmunohistoquímicas, se realizó una adquisición de imágenes mediante microscopía confocal (Olympus AF1000) con el software Olympus FluoView FV1000. Las imágenes fueron tomadas con el objetivo 40x. Para cada marcador, se utilizó el láser correspondiente a cada una de las ondas de excitación de los fluorocromos utilizados. Se tomaron 3 imágenes por hemisferio de corteza cerebral, así como 2 imágenes por hemisferio de médula espinal. Con este número de imágenes se conseguía obtener una visión completa de toda la región (FIGURA 23).

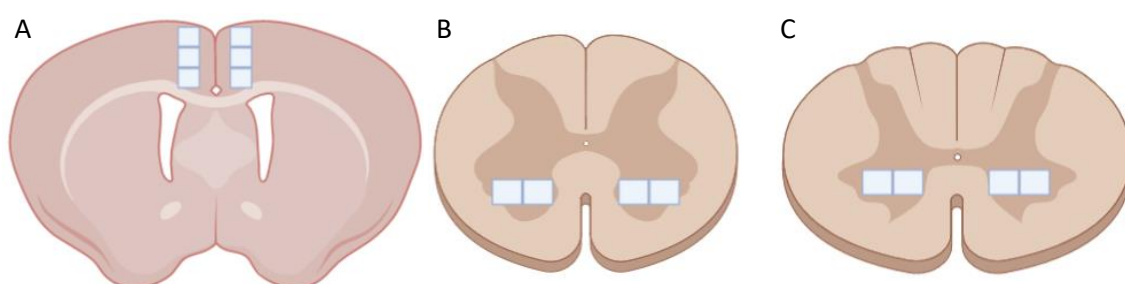


Figura 23: Localización de las imágenes tomadas. A. 3 fotos de corteza motora por hemisferio. B. 2 fotos de asta motora por hemisferio de médula cervical. C. 2 fotos de asta motora por hemisferio de médula lumbar.

Las imágenes se cuantificaron mediante el software ImageJ v. 1.8 (NIH). La cuantificación se realizó por densidad óptica y se automatizó para evitar errores humanos mediante la utilización de macros (ANEXO 4), siguiendo las características del programa. Se ajustó el *threshold* de cada imagen para evitar el posible ruido de fondo. El área de análisis fue determinada automáticamente por el programa de análisis del confocal.

Los resultados de TDP43 y Ubiquitina se realizaron analizando al menos 200 células (motoneuronas ChAT) por animal y área motora cortical y medular, en las que se determinó el índice de células que presentaron traslocación al citoplasma de la TDP43, así como la colocalización de inclusiones ubiquitinadas con TDP43.

Los resultados de Microglía se estudiaron mediante el análisis de Sholl (283, 284). El número de intersecciones se calculó utilizando círculos concéntricos de 10 μ m desde el soma de las células de microglía. Para cada animal se analizaron un mínimo de 300 células por grupo en 400 μ m² de diferentes secciones, a través de toda la extensión rostro-caudal de la corteza motora.

Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos, tanto de la parte electrofisiológica como la conductual, se realizaron con el software *IBM SPSS statistics* 25. Todos los resultados fueron analizados mediante una ANOVA de medidas repetidas (ANOVA MMRR) con un factor intersujeto. Se tomaron como significativos valores de p -valor $<0,005$. Los resultados se muestran como [F(gl del efecto, gl del error), p -valor]. Las comparaciones *post-hoc* se realizaron aplicando la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples.

Los análisis de la parte histológica fueron realizados mediante el software GraphPad Prism 8. Los resultados se analizaron mediante una ANOVA de una vía en el Modelo Crónico y mediante T-Student en el Modelo Agudo. Se tomaron como significativos valores de p -valor $<0,05$. En las gráficas se muestran los resultados como media \pm SEM (error estándar de la media).

RESULTADOS

Animales

Los animales se mantuvieron en condiciones adecuadas de bioterio, con agua y alimento (piensos comerciales) *ad libitum*, con elementos de medio ambiental enriquecido, y condiciones ambientales de temperatura $21\pm 1^{\circ}\text{C}$, permaneciendo en ciclos de luz/oscuridad 12:12 h.

Los animales de ambos modelos fueron asignados aleatoriamente a un grupo u otro, y todos ellos tanto en el Modelo Agudo como en el Modelo Crónico sobrevivieron al implante de la mini-bomba osmótica. En ningún momento del estudio presentaron signos de infección, ni convulsiones, agresividad, piloerección o postración, todos ellos signos o síntomas relacionados con el dolor y sufrimiento, de acuerdo con lo señalado en el apartado de bienestar animal del Proex 005/17. En los estudios electrofisiológicos tampoco hubo complicaciones, no viéndose afectados en ningún momento por la anestesia inhalatoria con isoflurano.

Resultados de Histología

Modelo Agudo

Microglía en corteza motora y médula espinal

Los resultados de la inmunohistoquímica de IBA1 en la corteza motora indicaron un aumento de la expresión de este marcador en el Grupo ELA con respecto al Grupo Control (FIGURA 24) (TABLA 14), sin embargo, este aumento no llega a ser significativo. A pesar de no ser significativo, sí que se observó un cambio en la morfología de estas células, además el número de células positivas para dicho marcador sí que es significativamente mayor en el Grupo ELA ($p=0,0004$). Las células del Grupo ELA presentaban una morfología predominantemente ameboide perdiendo gran número de sus arborizaciones, algo que no ocurre en el Grupo Control, evidenciado en el análisis cuantitativo de Sholl, donde se observó que el Grupo ELA presenta un número significativamente menor de intersecciones que el Grupo Control (FIGURA 25). Todo ello, el aumento en los niveles de marcaje, la forma ameboide y la reducción de ramificaciones es indicativo de una activación de este tipo celular.

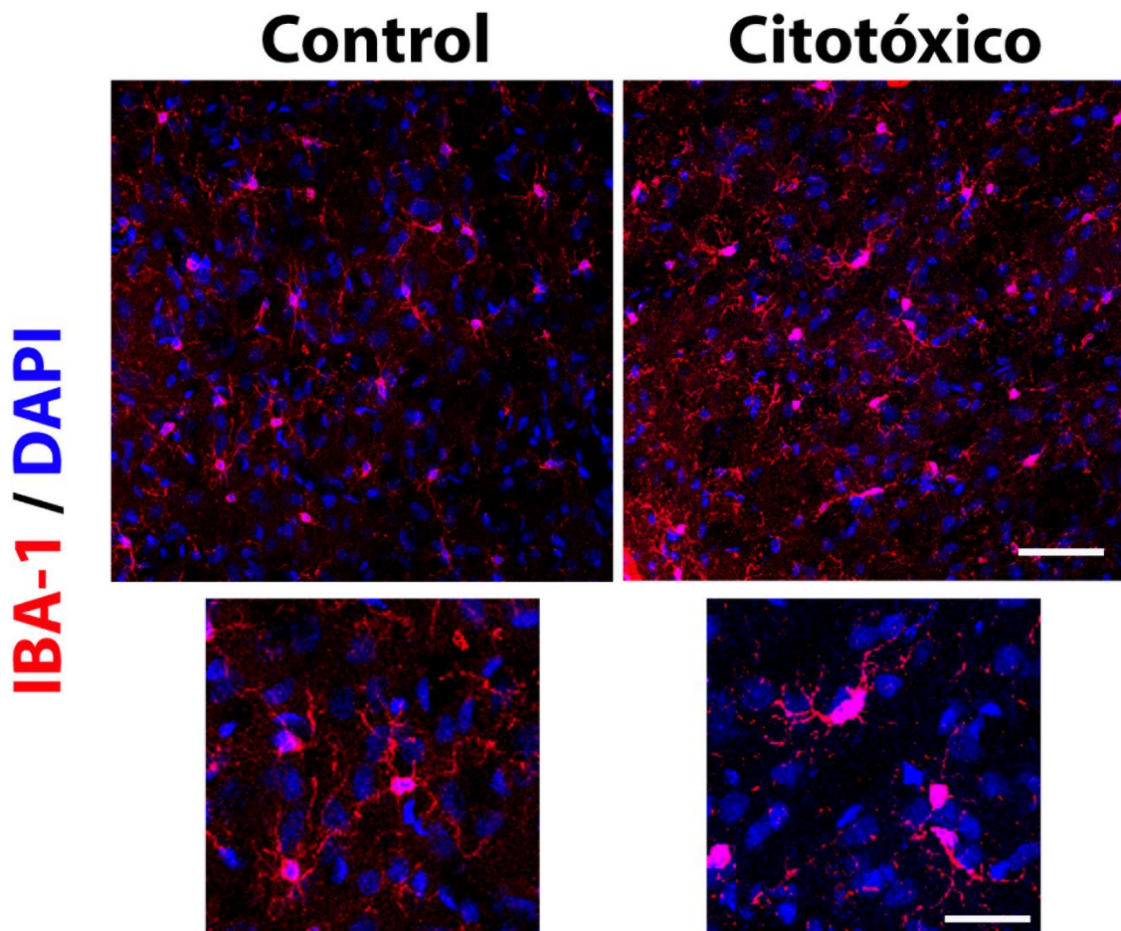


Figura 24: Resultados histológicos de IBA-1 en la Corteza Motora del Modelo Agudo. En rojo se marcan las células de microglía y en azul se marcan los núcleos. Escala: imágenes superiores 100 μm , imágenes inferiores en detalle 50 μm .

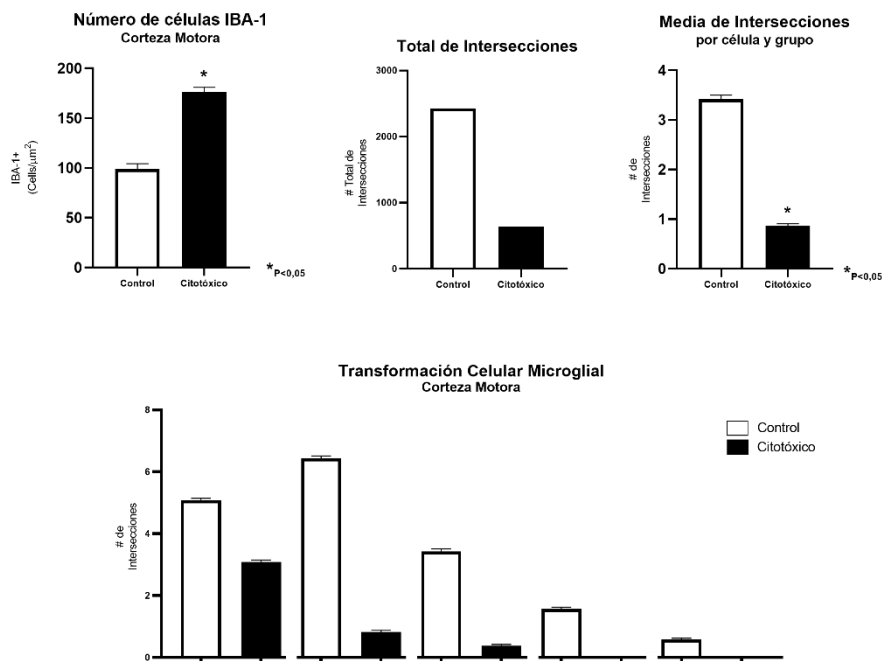


Figura 25: Resultados del análisis de IBA-1 en la Corteza Motora del Modelo Agudo. Se muestran el número de células IBA-1 positivas, así como el análisis de su fenotipo analizado mediante la técnica Sholl.

Los resultados de la inmunohistoquímica de IBA1 en médula espinal indicaron una disminución de la expresión de este marcador en el Grupo ELA con respecto al Grupo Control, sin llegar a ser significativo (FIGURA 26) (TABLA 14). A pesar de este descenso en los niveles de expresión, se observó un cambio en la morfología de estas células, además, cuando se analiza el número de células, este es significativamente superior en el Grupo ELA ($p=0,006$). Las células del Grupo ELA presentaban una morfología menos ramificada y con una forma más ameboide, evidenciado en el análisis de Sholl, donde se observó que el Grupo ELA presentaba una disminución en el número de intersecciones mayor que el Grupo control, además, la media de intersecciones del Grupo ELA era menor que la del Grupo Control (FIGURA 27). Estos resultados son indicativos de una activación de este tipo celular.

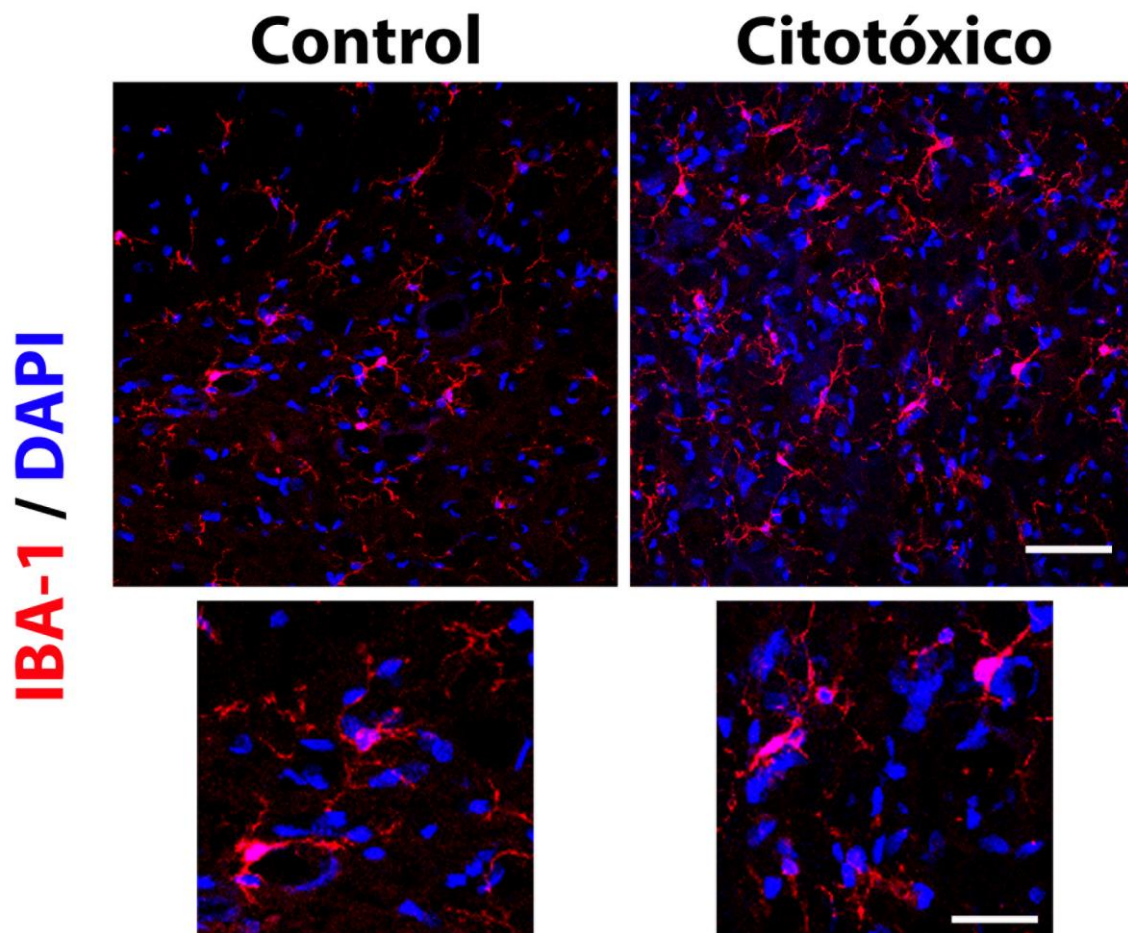


Figura 26: Resultados histológicos de IBA-1 en la Médula Espinal del Modelo Agudo. En rojo se marcan las células de microglía y en azul se marcan los núcleos. Escala: imágenes superiores 100 μm , imágenes inferiores en detalle 50 μm .

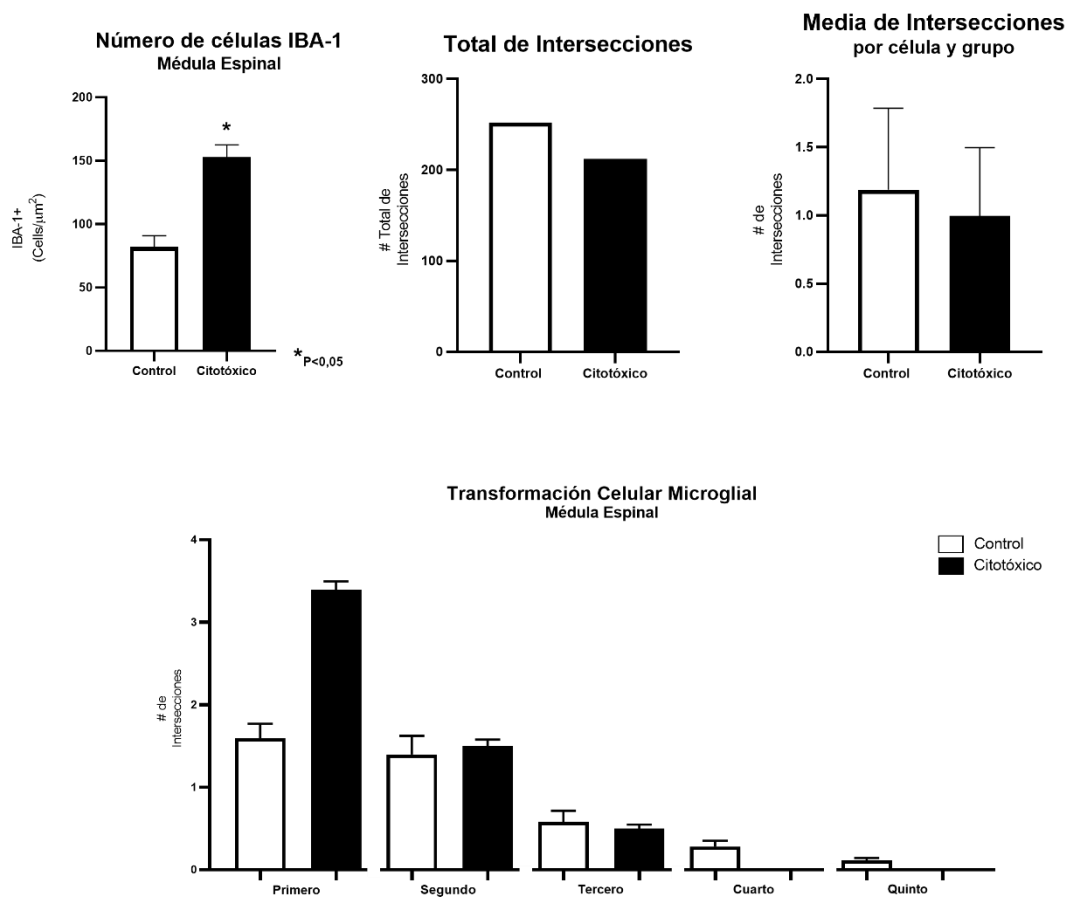


Figura 27: Resultados del análisis de IBA-1 en la Médula Espinal del Modelo Agudo. Se muestran el número de células IBA-1 positivas, así como el análisis de su fenotipo analizado mediante la técnica Sholl.

IBA1	Control	ELA
Corteza Motora	22987 \pm 6929	32087 \pm 5490
Médula Espinal	19996 \pm 3288	15943 \pm 2639

Tabla 14: Resultados del análisis del marcaje de IBA-1 tanto de la Corteza Motora como de la Médula Espinal del Modelo Agudo. Los resultados se muestran como Media \pm SEM.

Los cambios astrogliales provocados por la infusión de LCR se analizaron a través del marcador GFAP. Los resultados en la corteza motora de GFAP (FIGURA 28) indicaron un aumento significativo de los niveles de astrocitos en el Grupo ELA con respecto al Grupo Control ($p=0,0056$) (FIGURA 30) (TABLA 15). Estos resultados son indicativos de un aumento del marcaje en el citoesqueleto de los astrocitos, lo que demuestra una astrogliosis en el Grupo ELA, pasando a un estado activado. Esto correlaciona con el aumento de la microglía mencionado anteriormente, indicando una activación del proceso neuroinflamatorio en la corteza de estos animales.

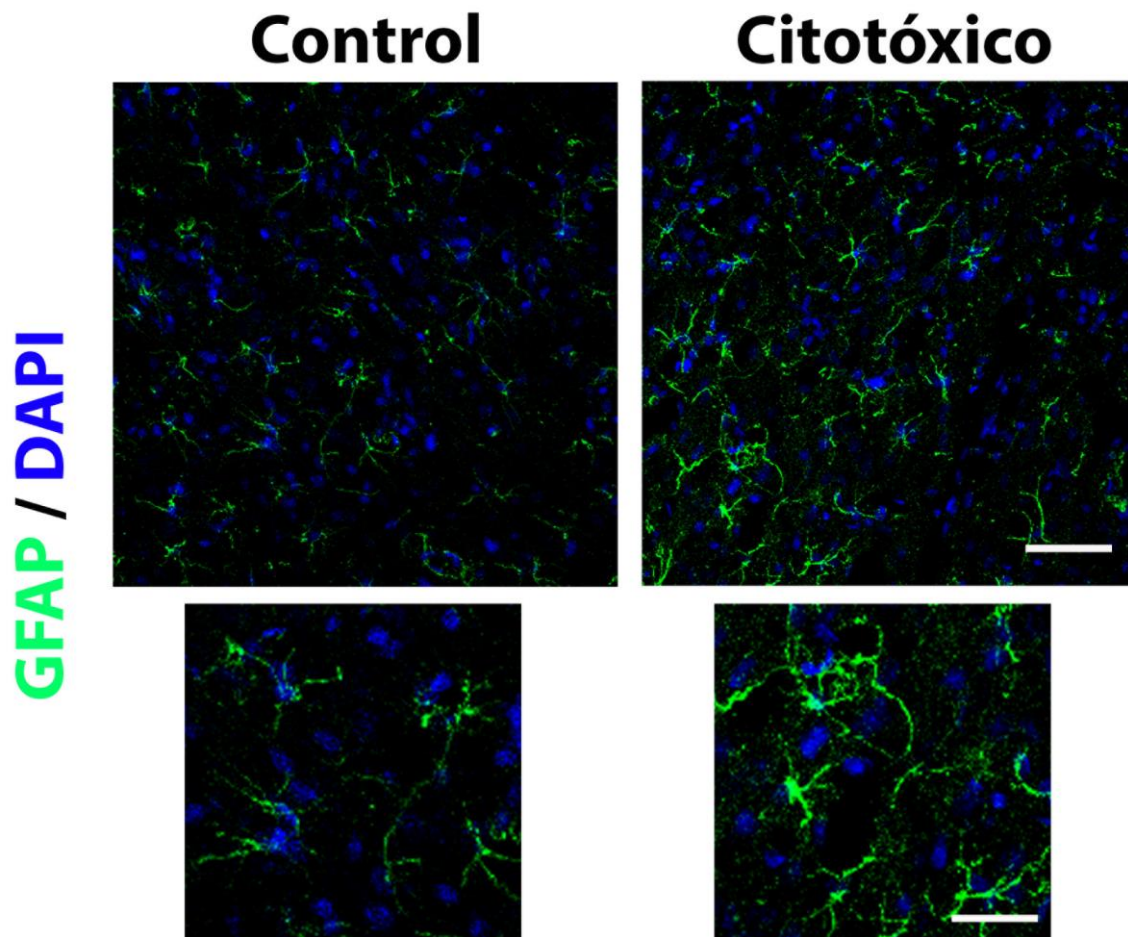


Figura 28: Resultados histológicos de GFAP en la Corteza Motora del Modelo Agudo. En verde se marcan los astrocitos y en azul se marcan los núcleos. Escala: imágenes superiores 100 μm , imágenes inferiores en detalle 50 μm .

Los resultados en médula espinal de GFAP indicaron que al igual que sucedía en corteza motora, existe un aumento significativo de los niveles de astrocitos en el Grupo ELA, mostrándose más protoplásmicos con respecto al Grupo Control ($p < 0,0001$) (FIGURA 29) (FIGURA 30) (TABLA 15).

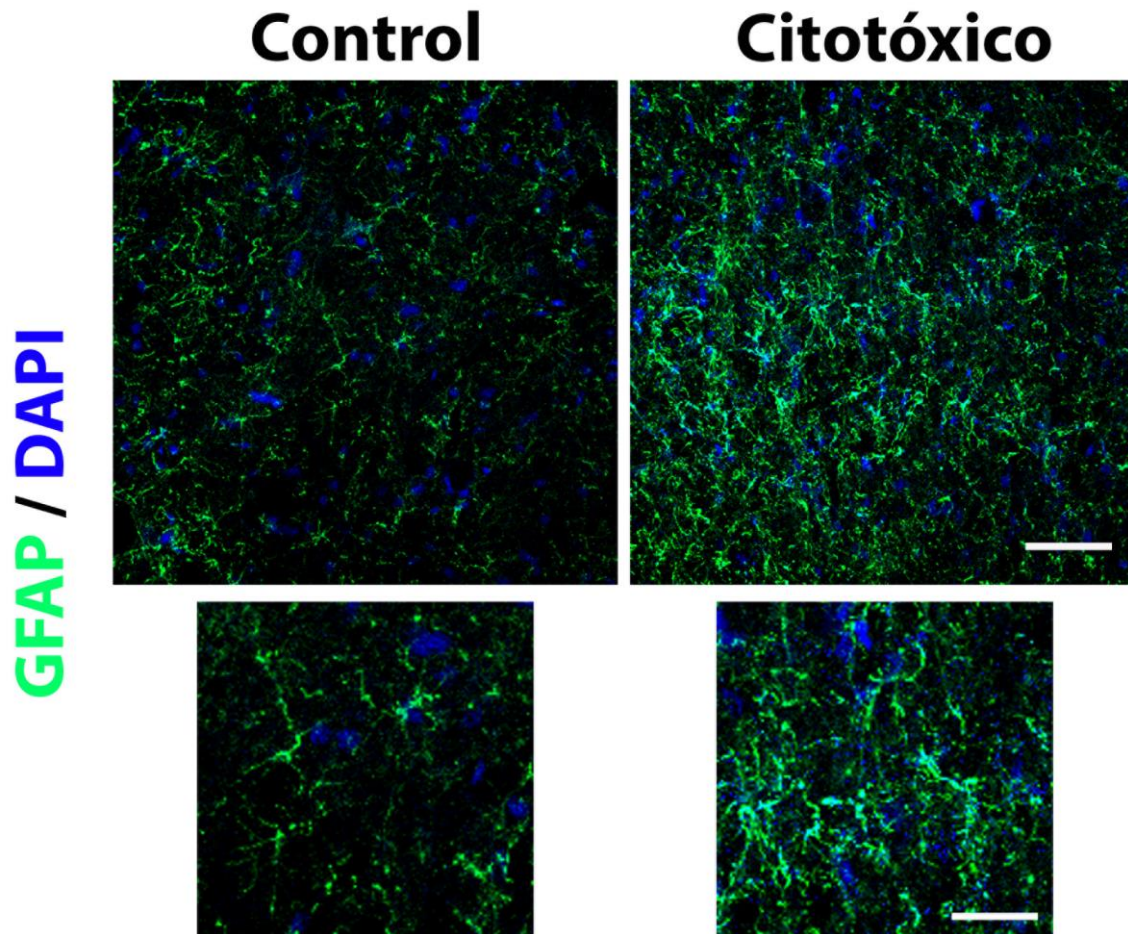


Figura 29: Resultados histológicos de GFAP en la Médula Espinal del Modelo Agudo. En verde se marcan los astrocitos y en azul se marcan los núcleos. Escala: imágenes superiores 100 μm , imágenes inferiores en detalle 50 μm .

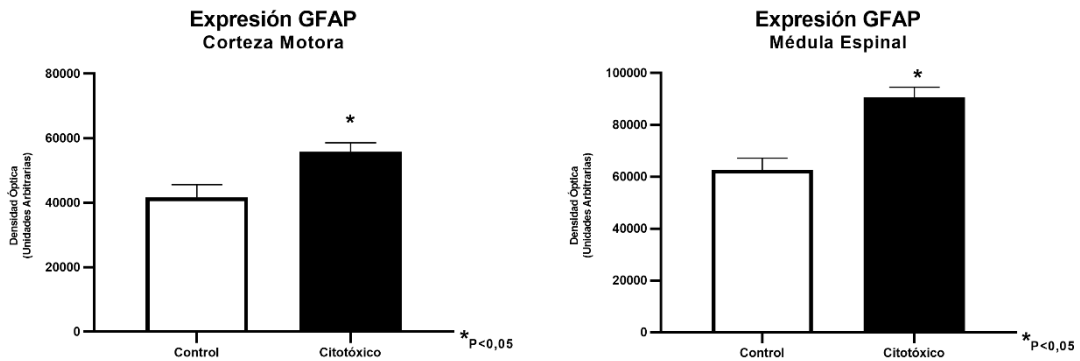


Figura 30: Resultados GFAP del Modelo Agudo. Se muestra la expresión de GFAP tanto en la Corteza Motora como en la Médula Espinal. Las gráficas muestran los valores de Media \pm SEM.

GFAP	Control	ELA
Corteza Motora	41701 \pm 3918	55812 \pm 2808
Médula Espinal	62653 \pm 4545	90529 \pm 4037

Tabla 15: Resultados del análisis del marcaje de GFAP tanto de la Corteza Motora como de la Médula Espinal del Modelo Agudo. Los resultados se muestran como Media \pm SEM.

Neuronas en corteza motora y médula espinal

El principal hallazgo tanto en pacientes como en modelos animales es la degeneración neuronal, es por ello que, en este estudio, se analizó la posible degeneración neuronal mediante el marcador NeuN, ya que es una proteína localizada en el núcleo y en el citoplasma perinuclear de neuronas del SNC y permite evaluar el estado de las neuronas, tanto en situaciones fisiológicas como patológicas, debido a que es específico de este tipo celular. Los resultados de las inmunohistoquímicas realizadas en corteza motora indicaron una disminución de la inmunorreactividad de este marcador en el Grupo ELA con respecto al Control, sin llegar a ser significativo ($p=0,0992$) (FIGURA 31) (TABLA 16).

Por su parte, los resultados de las inmunohistoquímicas realizadas en médula espinal también mostraban una disminución no significativa ($p=0,0636$) de los niveles de este marcador en el Grupo ELA con respecto al Control (FIGURA 31) (TABLA 16).

Los resultados tanto de corteza motora como de médula espinal indican que existe una pérdida de las neuronas en estos animales.

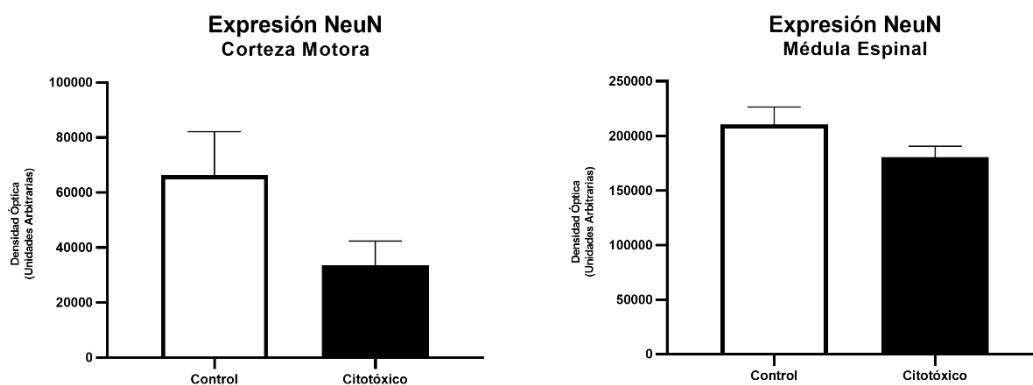


Figura 31: Resultados del análisis del marcaje de NeuN tanto en la Corteza Motora como en la Médula Espinal del Modelo Agudo. Las gráficas muestran los valores de Media±SEM.

NeuN	Control	ELA
Corteza Motora	66330 ± 15803	33579 ± 8784
Médula Espinal	210486 ± 15928	180571 ± 9976

Tabla 16: Resultados del análisis del marcaje de NeuN tanto de la Corteza Motora como de la Médula Espinal del Modelo Agudo. Los resultados se muestran como Media±SEM.

Acetilcolintransferasa en corteza motora y médula espinal

Al conocer los resultados de la pérdida neuronal en general, se analizaron de forma concreta los cambios en las motoneuronas ya que son el tipo neuronal más afectado en esta patología. La acetilcolintransferasa, enzima que cataliza la biosíntesis de acetilcolina, se encuentra exclusivamente en las neuronas colinérgicas del cerebro y la médula espinal, por lo que es un buen marcador para evaluar los cambios en las motoneuronas de este modelo.

Los resultados de la inmunohistoquímica de ChAT en corteza motora (FIGURA 32) indicaron una reducción significativa ($p=0,0103$) de la intensidad de este marcador en el Grupo ELA con respecto al Grupo Control, lo cual es indicativo de una reducción en el número de motoneuronas en estos tejidos.

Los resultados de la inmunohistoquímica de ChAT en médula espinal, al igual que los de corteza motora, indicaron una reducción significativa ($p=0,0001$) (FIGURA 33), de la intensidad de este marcador en el Grupo ELA con respecto al Grupo Control, lo que indica una reducción en el número de motoneuronas en estos tejidos. Además, el andamiaje neuronal, compuesto por la presencia de columnas organizadas de dendritas y axones, se preservaba en el Grupo Control, mientras que en el Grupo Citotóxico se observó no ordenado, con un patrón errático en la disposición de las dendritas, así como en la densidad de marcaje en las células ChAT positivas.

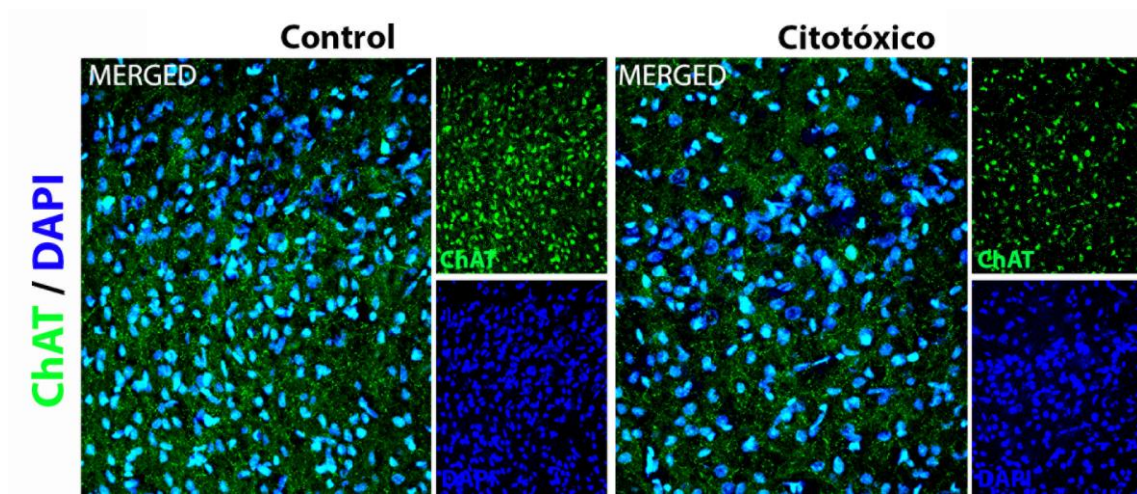


Figura 32: Resultados histológicos de ChAT en la Corteza Motora del Modelo Agudo. En verde se marcan los motoneuronas y en azul se marcan los núcleos.

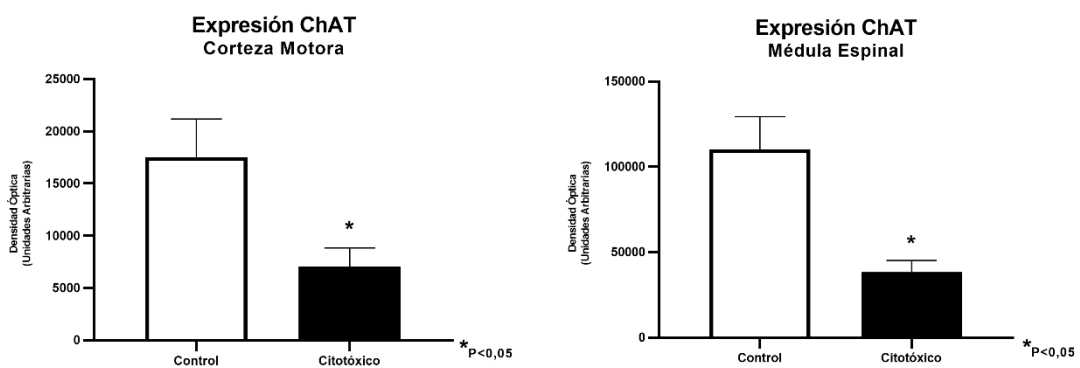


Figura 33: Resultados del análisis del marcaje de ChAT tanto en la Corteza Motora como en la Médula Espinal del Modelo Agudo. Las gráficas muestran los valores de Media \pm SEM.

Inclusiones intracitoplasmáticas en corteza motora y médula espinal

Uno de los aspectos más relevantes en la neuropatología de la ELA es la aparición de inclusiones intracitoplasmáticas, la mayoría de ellas positivas para TDP43, es por ello que en los tejidos del Modelo Agudo se analizó la presencia de estas inclusiones tanto en corteza motora como en médula espinal.

Los resultados (TABLA 17), tanto de corteza motora como de médula espinal (FIGURA 34) mostraban un aumento significativo ($p=0,0078$ y $p<0,0001$ respectivamente) de las inclusiones citoplasmáticas en el Grupo ELA con respecto al Grupo Control (FIGURA 35), indicativo de la desregulación de esta proteína y característico de esta patología.

ChAT	Control	ELA
Corteza Motora	17524 ± 3650	7039 ± 1785
Médula Espinal	110311 ± 19127	38411 ± 6775

Tabla 17: Resultados del análisis del marcaje de ChAT tanto de la Corteza Motora como de la Médula Espinal del Modelo Agudo. Los resultados se muestran como Media±SEM.

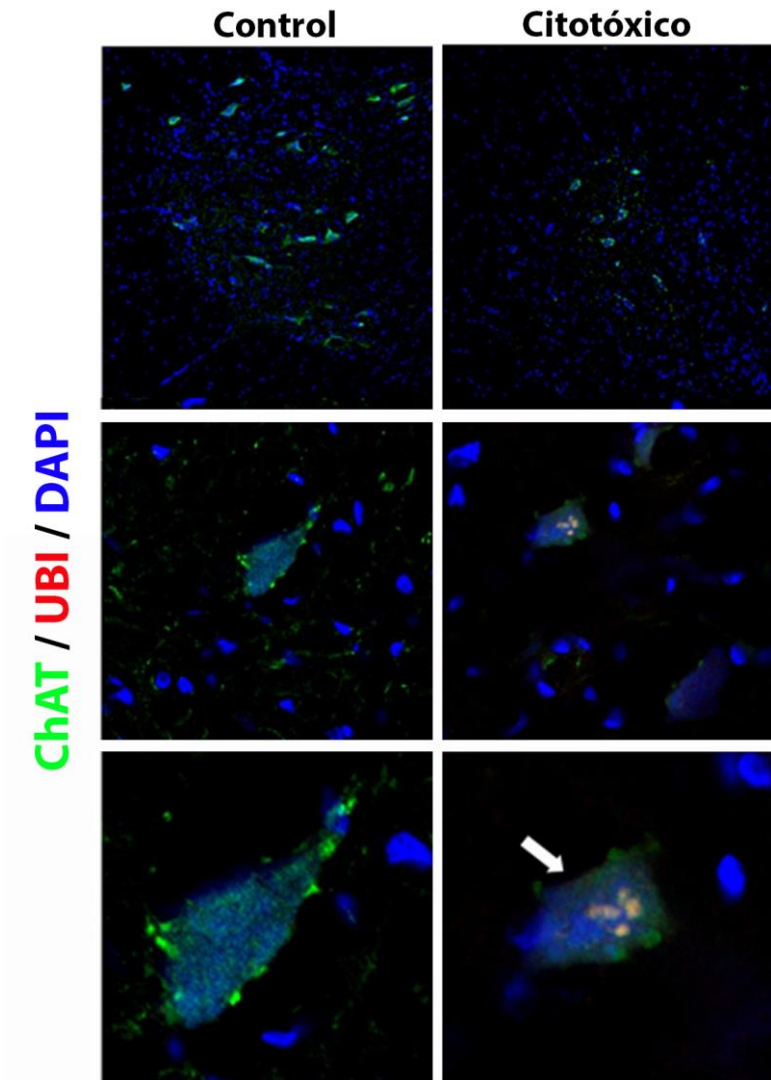


Figura 34: Resultados histológicos de ChAT y Ubiquitina en la Médula Espinal del Modelo Agudo. En verde se marcan las motoneuronas, en rojo las inclusiones ubiquitinadas y en azul se marcan los núcleos.

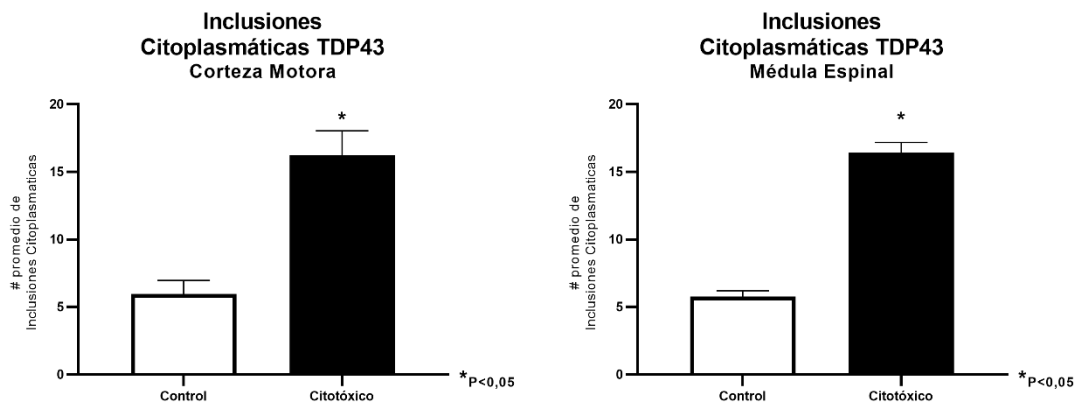


Figura 35: Resultados del número de inclusiones intracitoplasmáticas tanto en la Corteza Motora como en la Médula Espinal del Modelo Agudo. Las gráficas muestran los valores de Media±SEM.

Modelo Crónico

Microglía en corteza motora y médula espinal

Los resultados histológicos de IBA1 en corteza motora (FIGURA 36), de los animales del Modelo Crónico se analizaron mediante el análisis Sholl, teniendo en cuenta una superficie mínima de $400\mu\text{m}^2$. Los resultados mostraron un aumento significativo de la microgliosis en el Grupo ELA-Citotóxico ($p=0,0058$). Sin embargo, cuando se realiza el análisis de Sholl (FIGURA 37), el Grupo ELA-Citotóxico mostraba una reducción significativa de la media del número de intersecciones con respecto a los otros dos grupos, además el Grupo ELA-No Citotóxico mostraba menor número de intersecciones que el Control [$F(2, 5654)=1398, p<0,0001$].

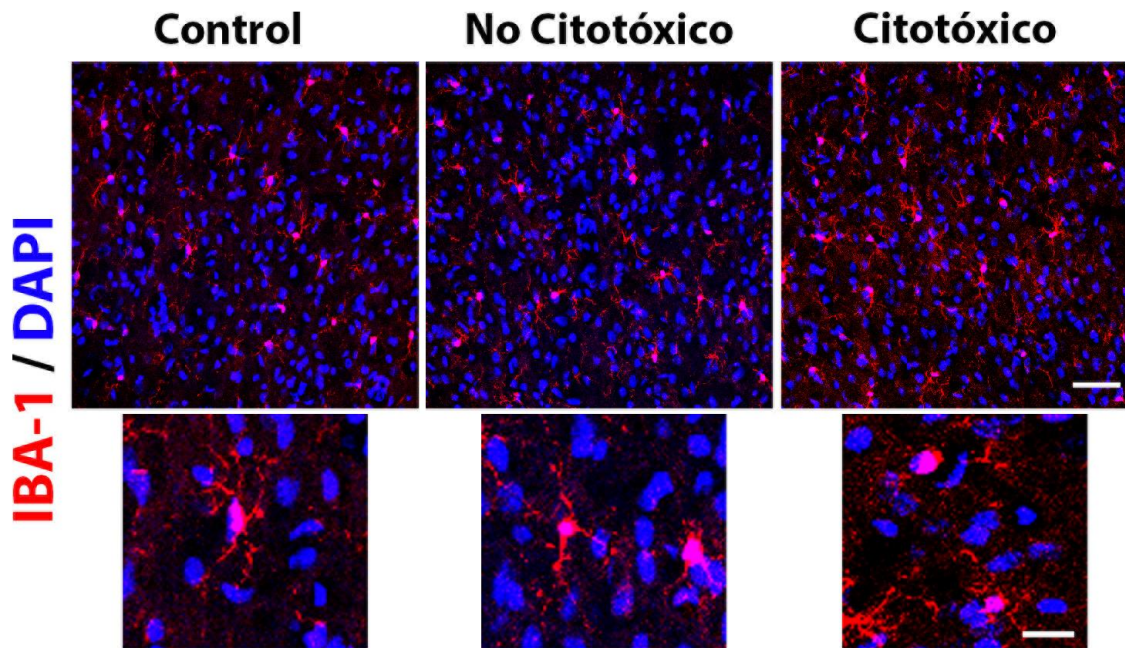


Figura 36: Resultados histológicos de IBA-1 en la Corteza Motora del Modelo Crónico. En rojo se marcan las células de microglía y en azul se marcan los núcleos.

Por su parte los resultados de IBA1 de médula espinal muestran un aumento significativo del número de células positivas para este marcador, indicando un aumento de la microgliosis en este tejido al igual que sucedía con la corteza motora. Los análisis de Sholl (FIGURA 38) muestran un cambio en la morfología, de forma transitoria, pasando de una morfología arborizada (quiescente en reposo) a una morfología ameboide y abastionada (activa y fagocítica) en el grupo de LCR Citotóxico.

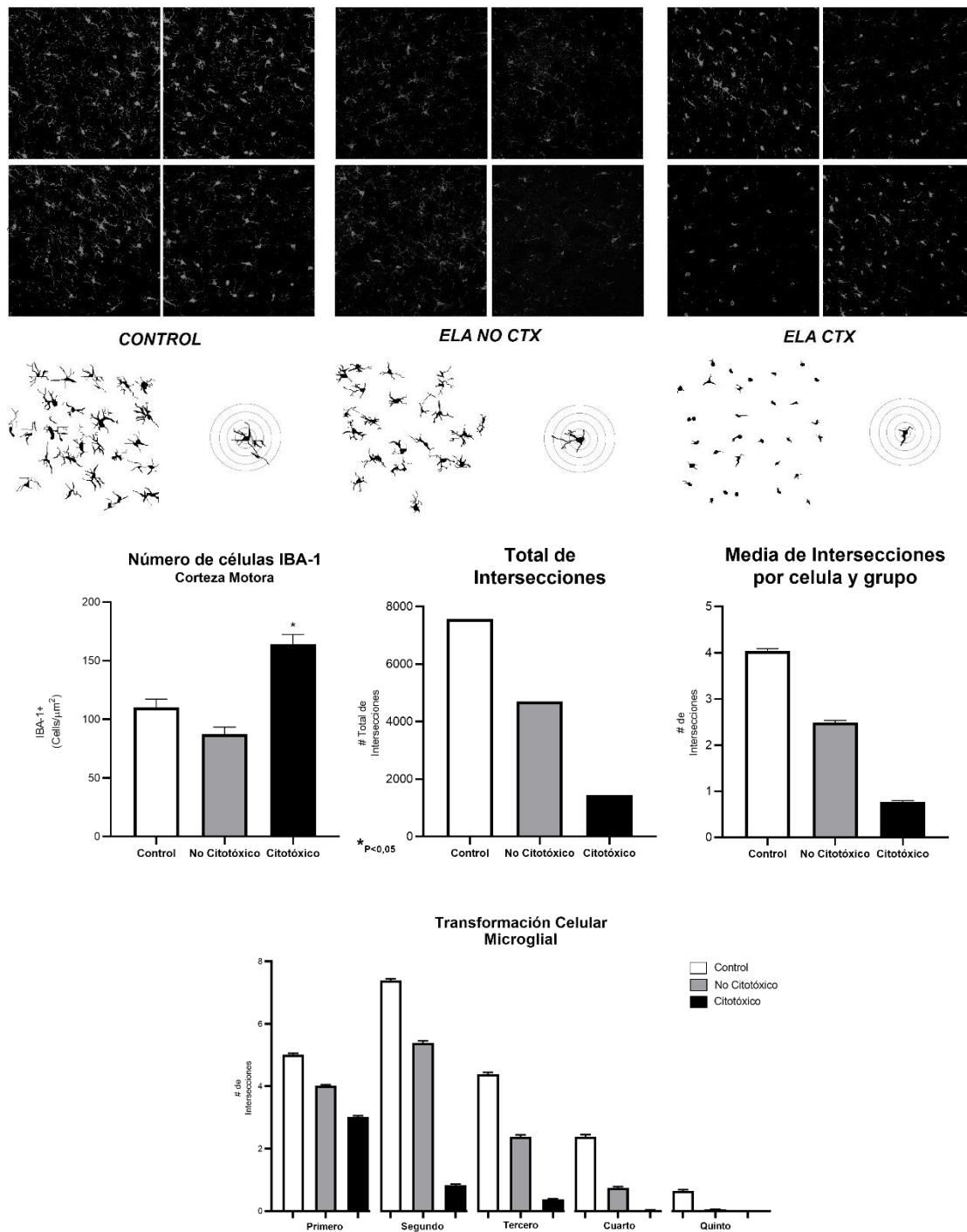


Figura 37: Resultados del estudio del estado de activación de la microglía en la Corteza Motora del Modelo Crónico a través del análisis de Sholl.

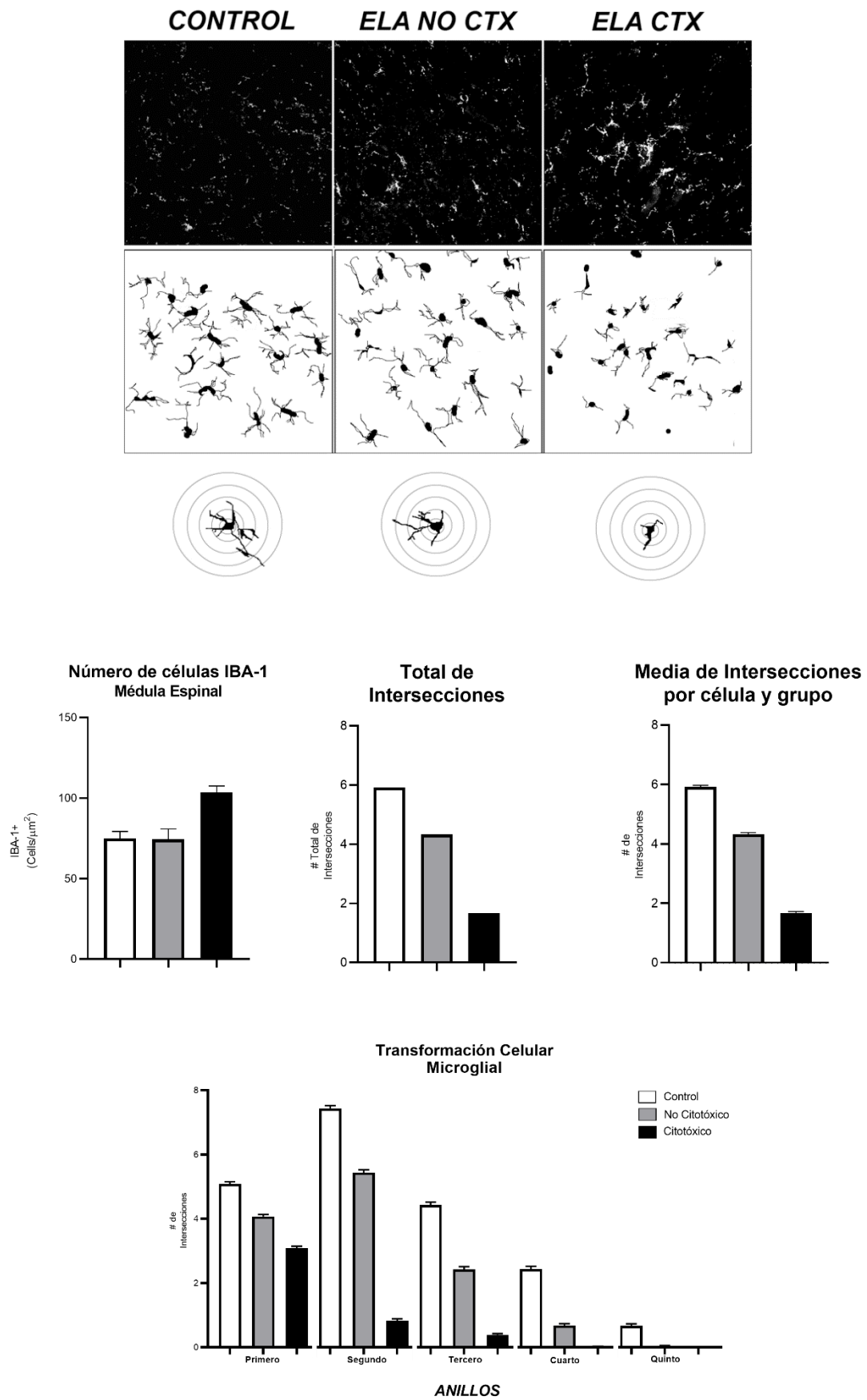


Figura 38: Resultados del estudio del estado de activación de la microglía en la Médula Espinal del Modelo Crónico a través del análisis de Sholl.

Además de efectuar este análisis, se realizaron otras dos inmunohistoquímicas para estudiar si la microglía mostraba patrones de polarización proinflamatorio (M1) o antiinflamatorio (M2), para ello se utilizaron los marcadores CD86, proteína característica de los estadios proinflamatorios o M1, y Arginasa1, enzima característica del estadio antiinflamatorio o M2.

Los resultados de CD86 en corteza motora (FIGURA 39) indican un aumento de los niveles de este marcador en el Grupo ELA-Citotóxico con respecto al Grupo Control y ELA-No Citotóxico, pero sin llegar a ser significativo estadísticamente [$F(2, 330)=2,448$, $p=0,0880$] (FIGURA 41). Por su parte, los resultados de ARG1 en corteza motora (FIGURA 39) muestran una reducción significativa del marcaje en el Grupo ELA-Citotóxico con respecto a los Grupos Control y ELA-No Citotóxico [$F(2, 355)=4,746$, $p=0,0092$] (FIGURA 42).

Los resultados de CD86 en médula espinal (FIGURA 40) indican un incremento significativo de los niveles de este marcador en el Grupo ELA-Citotóxico y ELA-No Citotóxico con respecto al Grupo Control [$F(2, 503)=16,89$, $p<0,0001$] (FIGURA 41). Por su parte, los resultados de ARG1 en médula espinal (FIGURA 40) indican diferencias significativas entre los grupos [$F(2, 447)=3,581$, $p=0,0286$], concretamente muestran un aumento no significativo del marcaje en el Grupo ELA-No Citotóxico ($p=0,5354$) y una reducción significativa en el Grupo ELA-Citotóxico ($p=0,0237$) (FIGURA 42).

Los resultados relativos a la microglía IBA1+ nos indican que, en el Grupo Control, las células de microglía se encontraban en un estadio quiescente o de reposo, con una forma más ramificada; por su parte en el Grupo ELA-No Citotóxico mostraba un descenso en el número de células positivas para este marcador, sin embargo, estas células comenzaban a presentar un fenotipo más activo, ya que el número de intersecciones en el análisis de Sholl es menor que en el Grupo Control. Por último, el Grupo ELA-Citotóxico mostraba un descenso mayor en el número de intersecciones, indicativo de que las células de microglía se encontraban en un estadio activado, con forma más ameboide.

Esto correlaciona con los resultados de polarización ya que observamos que, tanto en el estadio M1 como M2, los niveles de marcaje del Grupo Control eran inferiores, indicativo de la no activación microglial. Sin embargo, los niveles de estos marcadores eran mayores en los Grupos ELA, indicando la activación de este tipo celular. Es interesante indicar que el Grupo ELA-No Citotóxico presentaba una elevación del marcaje de ARG1, por lo cual estas células presentaban, así mismo, una microglía activada en estado antiinflamatorio, sin embargo, el Grupo ELA-Citotóxico presentaba mayor marcaje en CD86, indicativo de activación microglial en estado pro-inflamatorio.

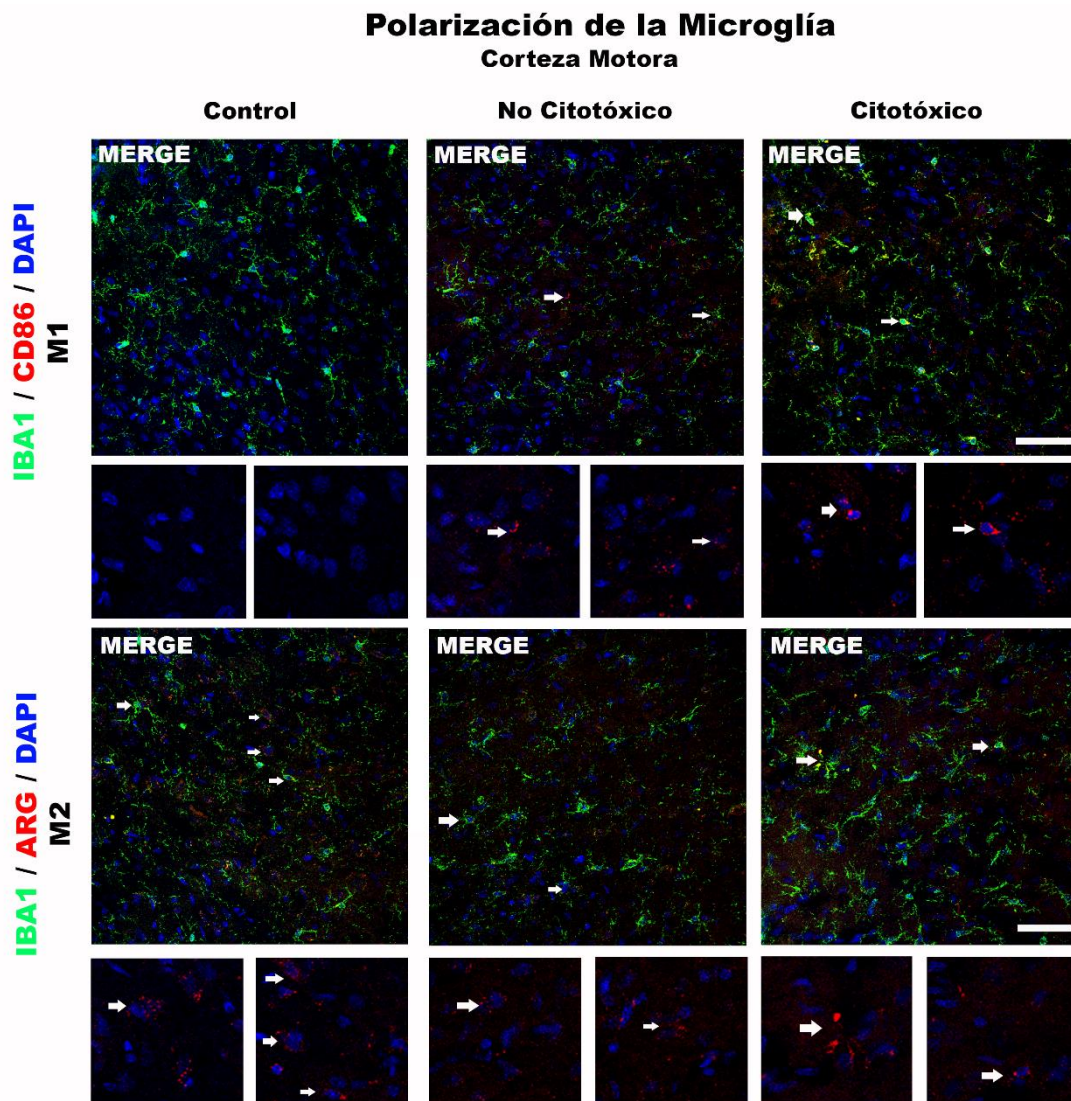


Figura 39: Resultados de la polarización (M1 y M2) de la microglía en la Corteza Motora del Modelo Crónico. En la parte superior se representa en verde las células IBA-1+, en rojo las células CD86+ y en azul los núcleos. En la parte inferior se representa en verde las células IBA-1+, en rojo las células ARG-1+ y en azul los núcleos. Escala 100 µm.

Polarización de la Microglia Médula Espinal

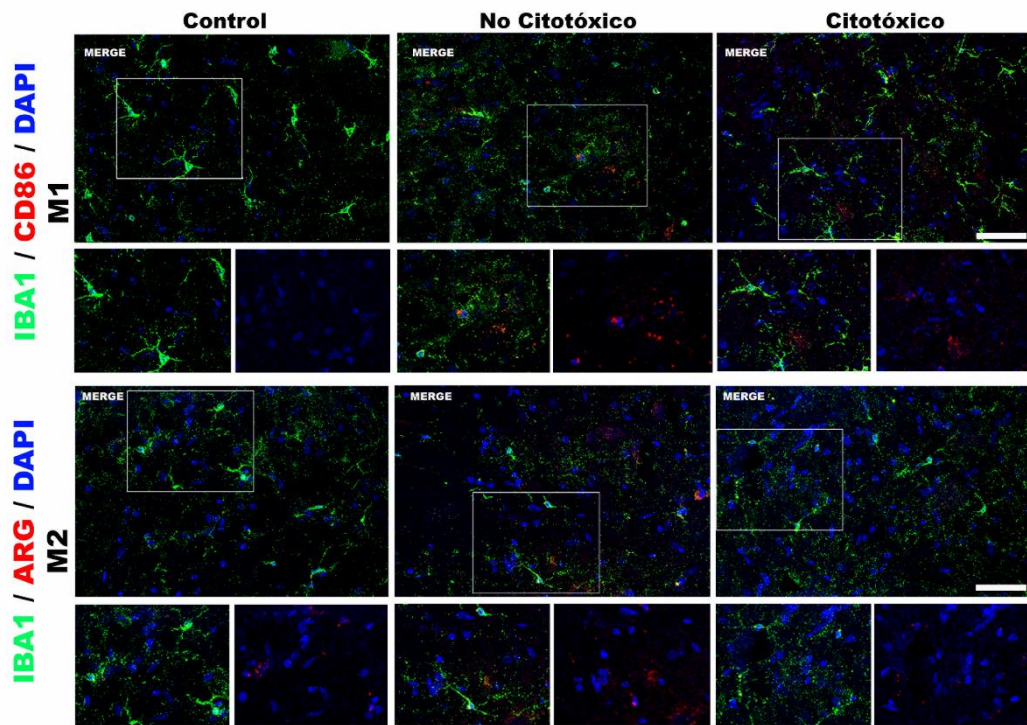


Figura 40: Resultados de la polarización (M1 y M2) de la microglía en la Médula Espinal del Modelo Crónico. En la parte superior se representa en verde las células IBA-1+, en rojo las células CD86+ y en azul los núcleos. En la parte inferior se representa en verde las células IBA-1, en rojo las células ARG-1+ y en azul los núcleos. Escala 100 μ m.

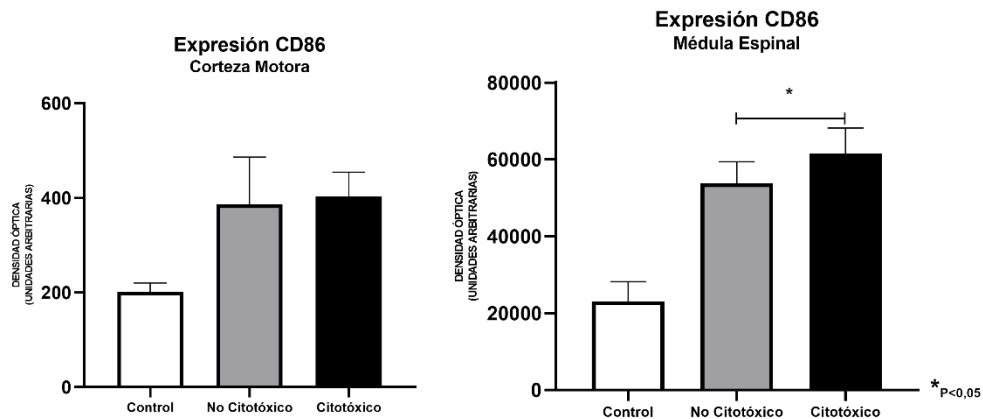


Figura 41: Resultados del análisis de la intensidad de marcaje de CD86 tanto en Corteza Motora como en Médula Espinal del Modelo Crónico. Las gráficas muestran los valores de Media \pm SEM.

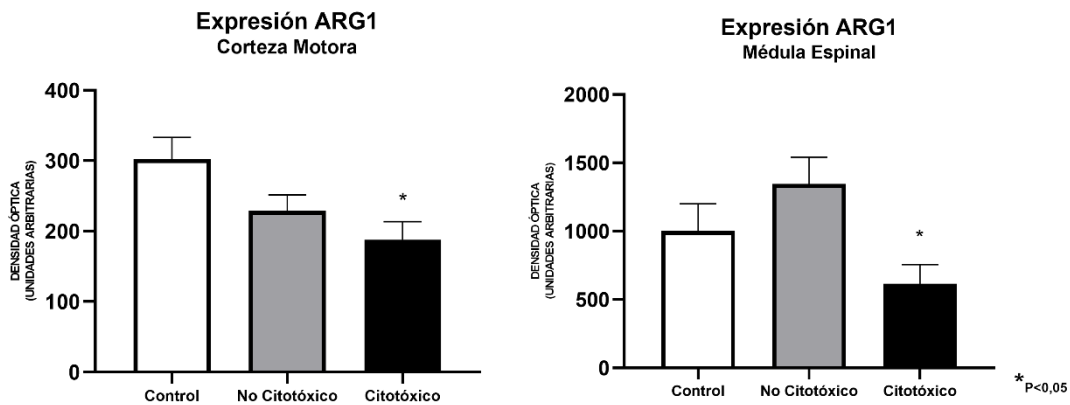


Figura 42: Resultados del análisis de la intensidad de marcaje de ARG-1 tanto en Corteza Motora como en Médula Espinal del Modelo Crónico. Las gráficas muestran los valores de Media±SEM.

Complejo Mayor de Histocompatibilidad II en corteza motora y médula espinal

El MHCII es una glicoproteína de membrana de las células presentadoras de antígenos. Interviene en el desarrollo de las respuestas inmunes específicas tanto humoral como celular, participando en el reconocimiento de los antígenos por los linfocitos T y, en consecuencia, en el proceso neuroinflamatorio durante el desarrollo de la patología, además forma parte de los marcadores propios de la polarización microglial de la fase M1. Se realizó una inmunohistoquímica para este marcador y los resultados de corteza motora (FIGURA 43), indicaron un aumento significativo [$F(2,165)=9,449$, $p=0,0001$] del marcaje tanto en el Grupo ELA-No Citotóxico ($p=0,0459$) como en el Grupo ELA-Citotóxico ($p<0,0001$) con respecto al Grupo Control. Por su parte los resultados de médula espinal mostraban un aumento significativo de este marcador en el Grupo ELA-Citotóxico [$F(2,48)=4,659$, $p=0,0142$] siendo significativo en este caso solo el Grupo ELA-Citotóxico ($p=0,0196$) (FIGURA 44).

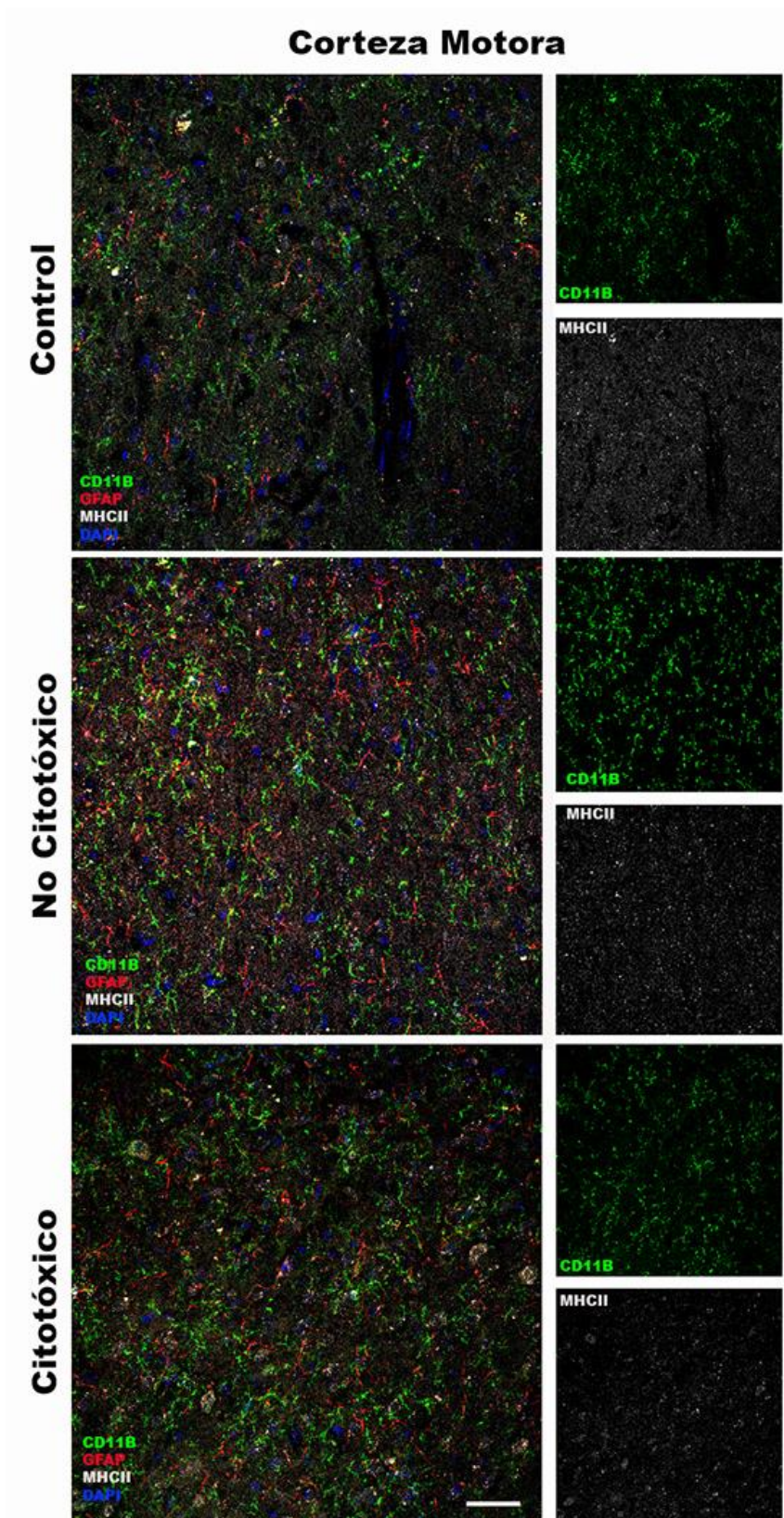


Figura 43: Resultados histológicos de MHCII, CD11b y GFAP en la Corteza Motora del Modelo Crónico. En rojo se muestran las células GFAP+, en blanco las células MHCII+, en verde las células CD11b+ y en azul los núcleos. Escala 100 μ m.

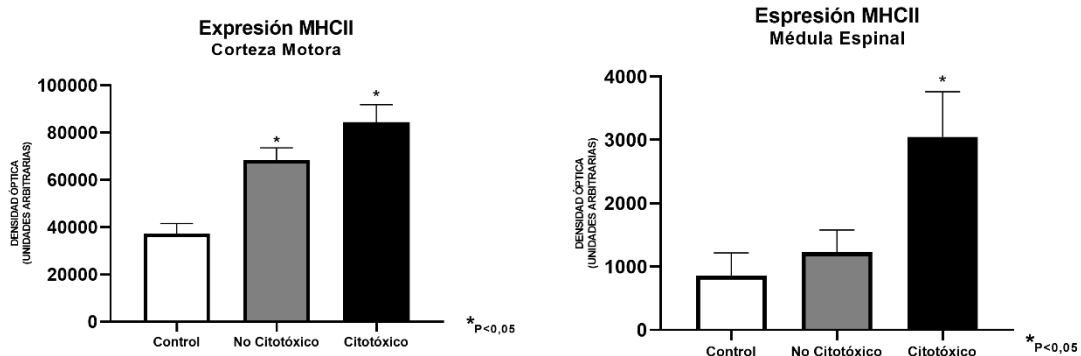


Figura 44: Resultados del análisis de la intensidad de marcaje de MHCII tanto en Corteza Motora como en Médula Espinal del Modelo Crónico. Las gráficas muestran los valores de Media±SEM.

Astroglía en corteza motora y médula espinal

A continuación, se procedió a analizar otro aspecto del proceso neuroinflamatorio, analizando los cambios en los astrocitos. Para ello, se realizaron inmunohistoquímicas utilizando como marcador la GFAP. Los resultados en la corteza motora (FIGURA 45), indicaron un aumento significativo de los niveles de astrocitos en el Grupo ELA-Citotóxico [$F(2, 27)=5,020$, $p=0,0140$]. Los resultados en médula espinal (FIGURA 46) indicaron un aumento significativo de los niveles de astrocitos en el Grupo ELA-Citotóxico [$F(2, 45)=5,558$, $p=0,07$]. Estos resultados mostraron un aumento de la astrogliosis en los Grupos ELA en estos tejidos, indicando la activación de este tipo celular tanto en la corteza como en la médula (FIGURA 47). Esto correlacionaba con el incremento de la microglía mencionado anteriormente, indicando una activación del proceso neuroinflamatorio en la corteza de estos animales.

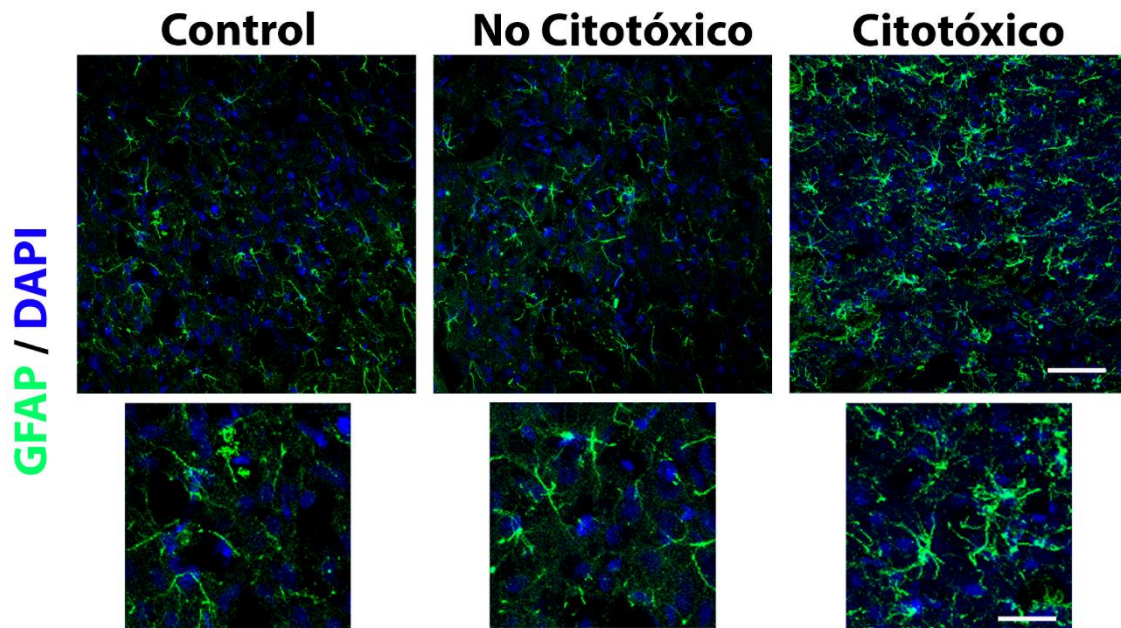


Figura 45: Resultados histológicos de GFAP en la Corteza Motora del Modelo Crónico. En verde se marcan los astrocitos y en azul se marcan los núcleos. Escala: imágenes superiores: 100 μm , imágenes en detalle: 50 μm

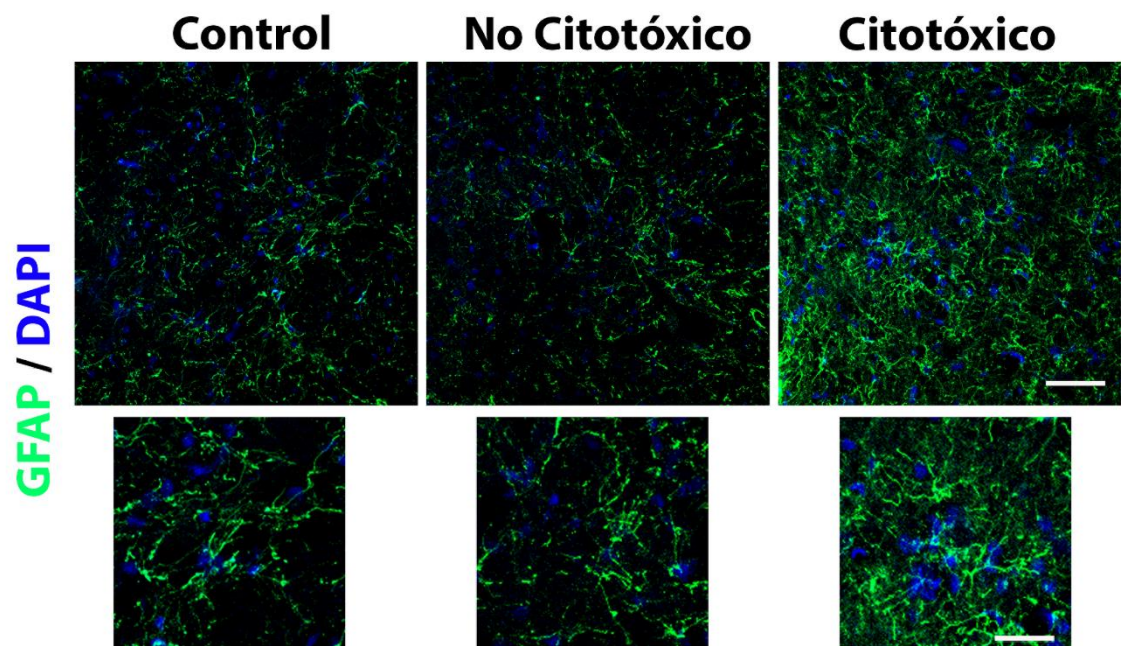


Figura 46: Resultados histológicos de GFAP en la Médula Espinal del Modelo Crónico. En verde se marcan los astrocitos y en azul se marcan los núcleos. Escala: imágenes superiores: 100 μm , imágenes en detalle: 50 μm

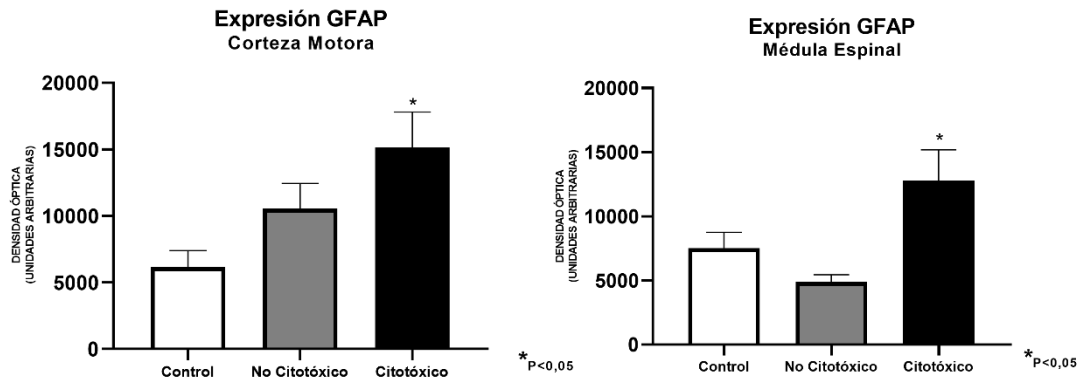


Figura 47: Resultados del análisis del marcaje de GFAP del Modelo Crónico. Se muestra la expresión de GFAP tanto en la Corteza Motora como en la Médula Espinal. Las gráficas muestran los valores de Media±SEM.

Acetilcolintransferasa en corteza motora y médula espinal

Los resultados de la inmunohistoquímica de ChAT en la corteza motora [F(2, 1069)=44,29, $p < 0,0001$] (FIGURA 48), indicaron una reducción significativa de la intensidad de este marcador en la corteza motora del Grupo ELA-Citotóxico ($p < 0,0001$), esto es indicativo de una reducción en el número de motoneuronas en estos tejidos. En el Grupo ELA-No Citotóxico había un aumento de los niveles de marcaje con respecto a los dos Grupos ($p = 0,003$). La variación en el marcaje observada en los tres grupos se correlaciona con el aumento de las células ChAT positivas a caspasa 3, siendo este marcaje más acusado en la médula espinal (FIGURAS 49 y 50).

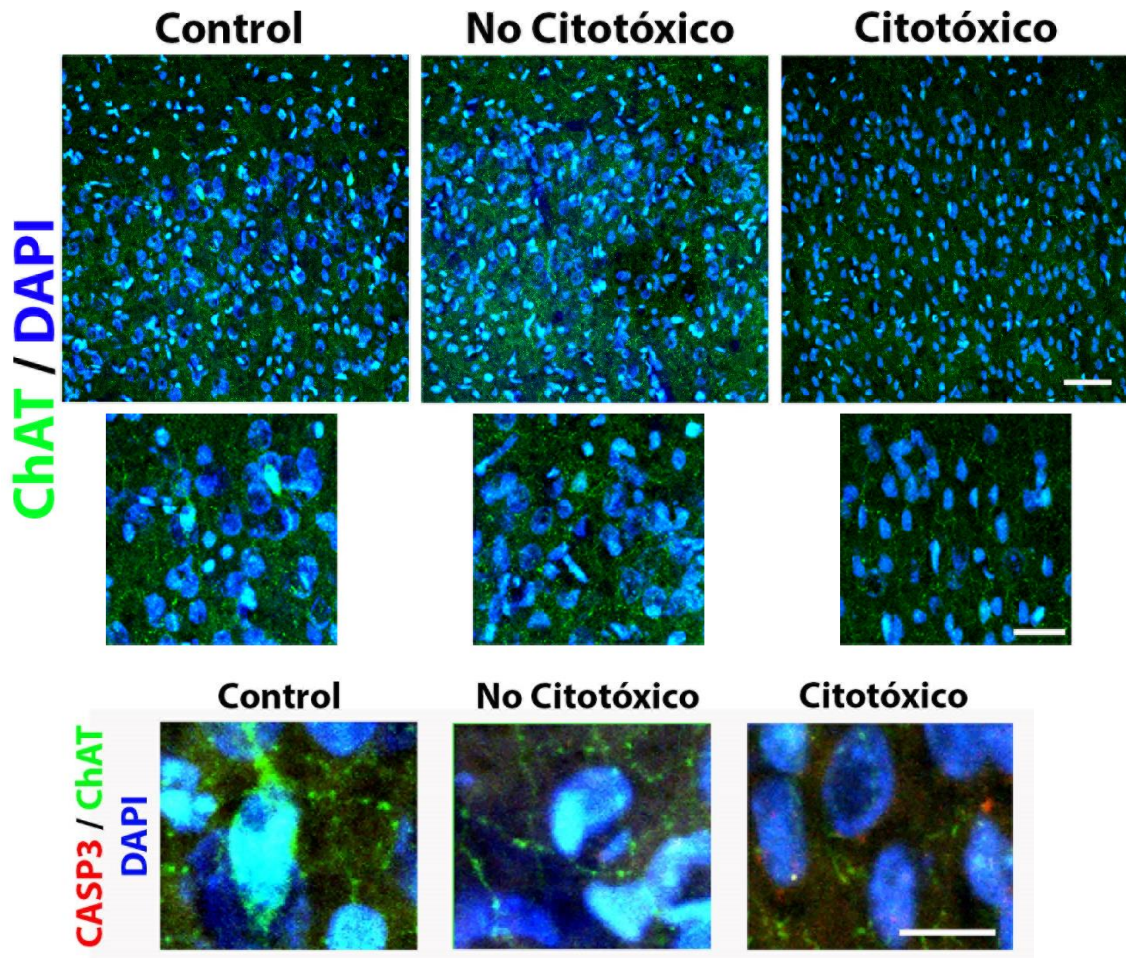


Figura 48: Resultados histológicos de ChAT y Caspasa 3 en la Corteza Motora del Modelo Crónico. En verde se marcan los motoneuronas, en azul se marcan los núcleos y en rojo las células Caspasa 3+. Escala: imágenes superiores: 100 μm, imágenes parte media: 50 μm, imágenes detalle: 10 μm.

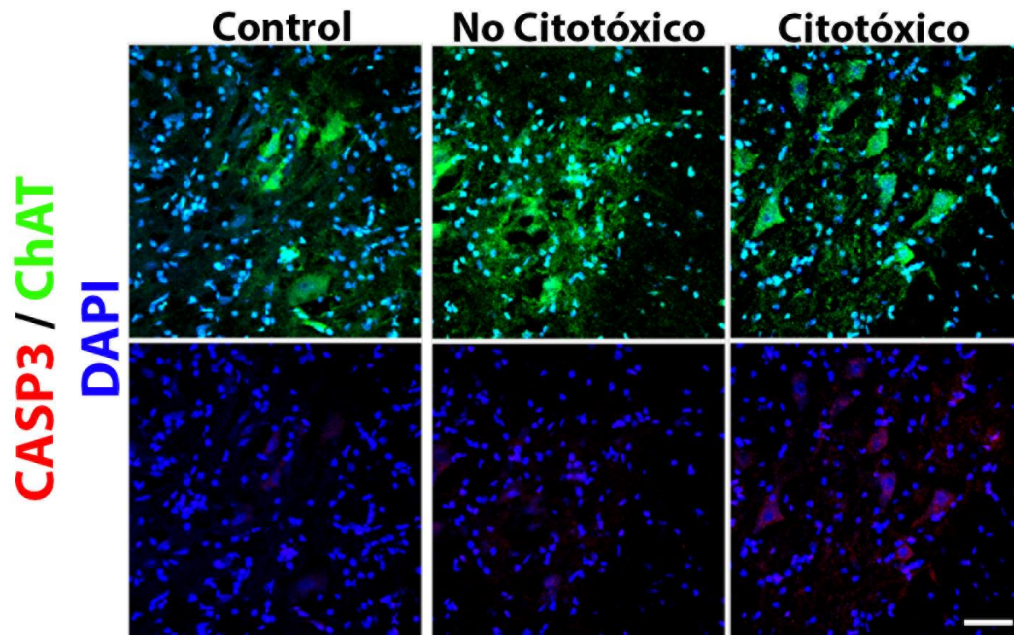


Figura 49: Resultados histológicos de ChAT y Caspasa 3 en la Médula Espinal del Modelo Crónico. En verde se marcan los motoneuronas, en azul se marcan los núcleos y en rojo las células Caspasa 3+. Escala 50 μ m.

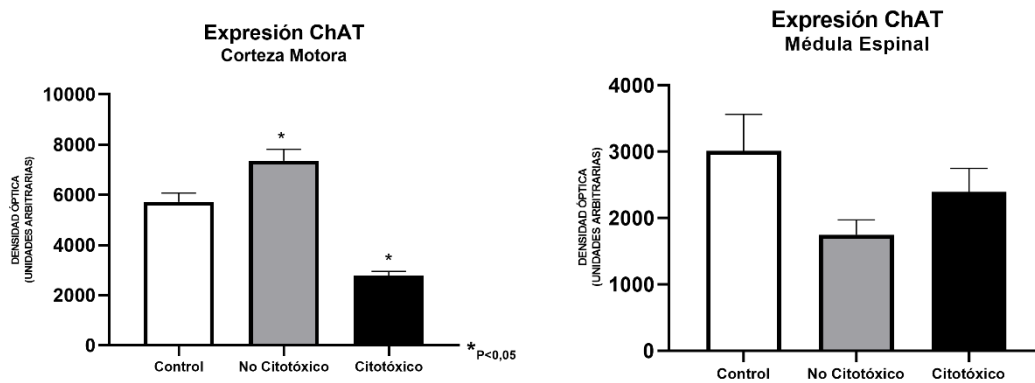


Figura 50: Resultados del análisis del marcaje de ChAT tanto en la Corteza Motora como en la Médula Espinal del Modelo Crónico. Las gráficas muestran los valores de Media \pm SEM.

Neurofilamentos en corteza motora y médula espinal

Los neurofilamentos son unas proteínas estructurales del citoesqueleto de los axones. Los resultados de la inmunohistoquímica en la corteza motora evidencian una estructura conservada de estos neurofilamentos en el Grupo Control, mientras en los Grupos ELA se produce una desorganización, así como agregación, además de mostrar una disminución en los niveles de marcaje (FIGURA 51). Por su parte los resultados de la médula espinal indicaron una marcada reducción de los niveles de neurofilamentos en el Grupo ELA-Citotóxico.

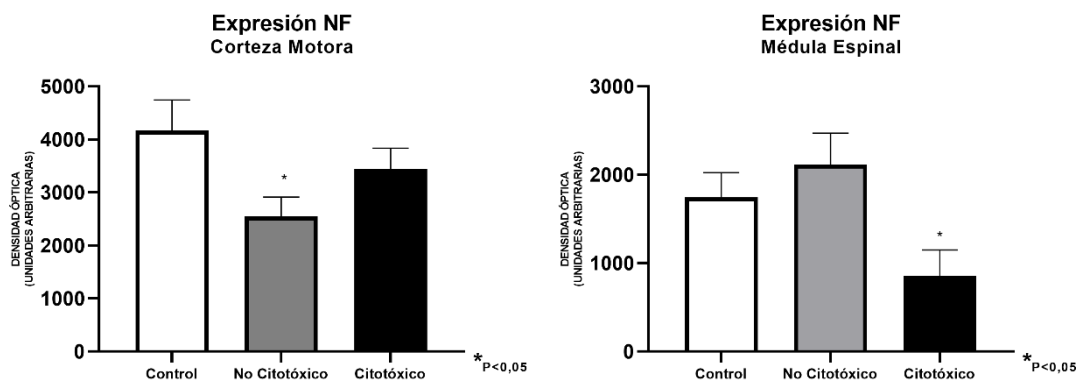


Figura 51: Resultados del análisis del marcaje de Neurofilamentos tanto en la Corteza Motora como en la Médula Espinal del Modelo Crónico. Las gráficas muestran los valores de Media±SEM.

Inclusiones intracitoplasmáticas en corteza motora y médula espinal

Al igual que sucedía en el Modelo Agudo, era interesante evaluar si la infusión crónica de LCR produciría una traslocación de TDP43 al citoplasma de las motoneuronas, es por ello que se realizó una inmunohistoquímica para TDP43 y los resultados de la corteza motora (FIGURA 52) indicaron un aumento de las inclusiones de TDP43 en los grupos ELA [F(2, 6)=212,6, p<0,0001], llegando a ser significativo en el Grupo ELA-Citotóxico (p<0,0001). Por su parte en la médula espinal (FIGURA 53), se observaba la misma tendencia [F(2, 15)=94,77, p<0,0001], siendo el aumento significativo en el Grupo ELA-Citotóxico (p<0,0001) (FIGURA 54). Además, la presencia de inclusiones ubiquitinadas muestran que es evidente una alteración de la vía del proteasoma, ya que la traslocación del núcleo al citoplasma de la TDP43 en agregados o inclusiones activa esta vía, la cual es responsable de la degradación de agregados de proteínas y de la eliminación de proteínas mal plegadas. En los animales citotóxicos fue evidente el incremento de las inclusiones y su localización con la expresión de TDP43 citoplasmático.

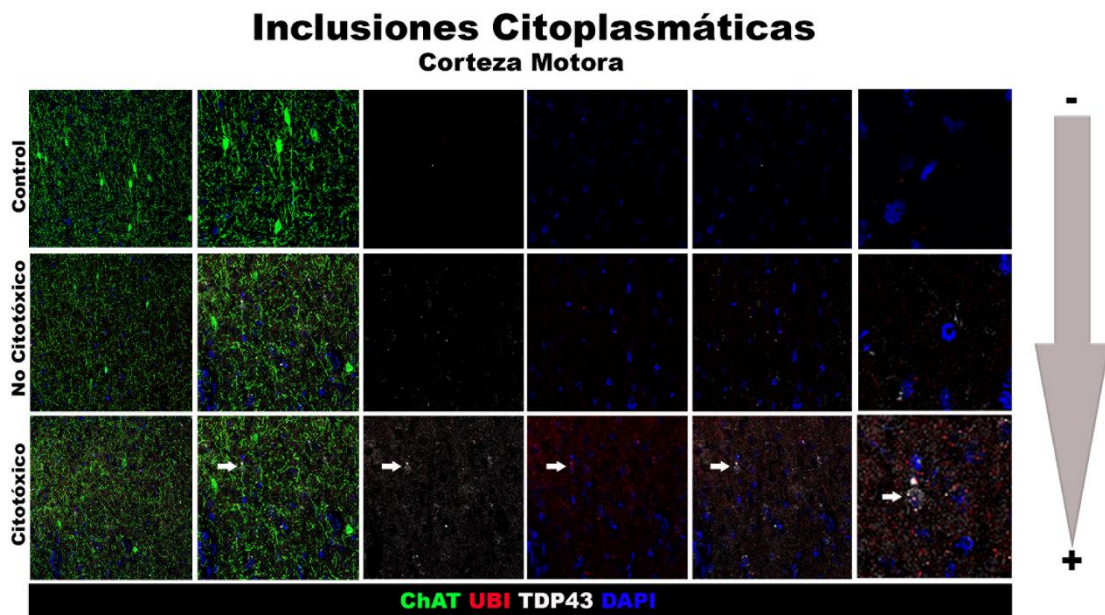


Figura 52: Inclusiones intracitoplasmáticas en la Corteza Motora. se muestran en verde las motoneuronas, en rojo la ubiquitina, en blanco la TDP43 y en azul los núcleos. Escala 100 μ m.

Inclusiones Citoplasmáticas Médula Espinal

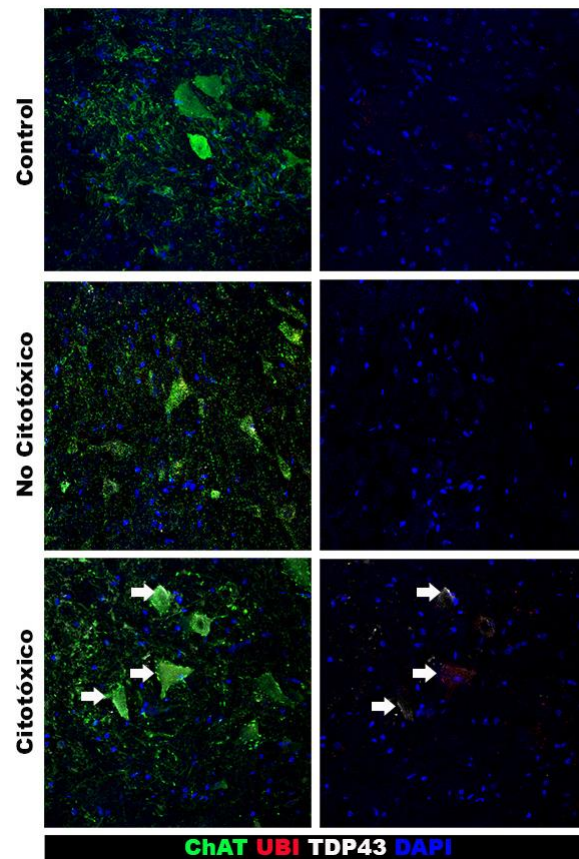


Figura 53: Inclusiones intracitoplasmáticas en la Médula Espinal. se muestran en verde las motoneuronas, en rojo la ubiquitina, en blanco la TDP43 y en azul los núcleos. Escala 100 μ m

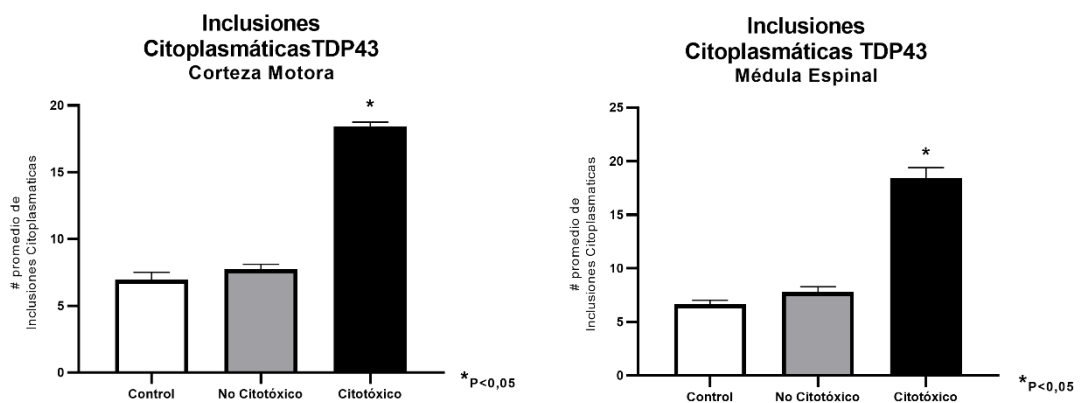


Figura 54: Resultados del número de inclusiones intracitoplasmáticas, tanto en la Corteza Motora como en la Médula Espinal del Modelo Crónico. Las gráficas muestran los valores de Media \pm SEM.

Resultados electrofisiológicos

Como parte del estudio Agudo y Crónico, se realizó un EMG a los animales, donde se registró el reflejo H estimulando en el espacio retromaleolar y registrando en la región plantar.

Para estudiar la dinámica de reclutamiento de las ondas M y H que se producen en el reflejo H, así como para determinar la intensidad a la que se estabilizan las amplitudes de M y H (intensidad de interés para luego aplicar el protocolo de frecuencias), se siguió el siguiente protocolo: se fijó la frecuencia a 0,2Hz y se fue aumentando progresivamente la intensidad de los estímulos desde 0,1mA hasta 10mA. Concretamente, se dieron un mínimo de 5 pulsos en cada una de las siguientes intensidades: 0.1; 0.3; 0.5; 0.7; 0.9; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9 y 10 mA.

Para para estudiar las respuestas tanto directas (onda M), como a través de la sinapsis espinal, para generar la onda H en función del aumento de las frecuencias (Hz), se siguió el siguiente protocolo: se fijó la intensidad a la cual las ondas M y H se estabilizaron en el protocolo de intensidades y se fue aumentando progresivamente la frecuencia desde 0,2Hz hasta 10Hz. En concreto se dieron un mínimo de 5 pulsos en cada una de las siguientes frecuencias: 0.2; 0.5; 1; 2; 4; 6; 8; y 10 Hz

A continuación, se muestran los resultados obtenidos divididos por protocolo y onda.

Modelo Agudo

Intensidades onda M Modelo Agudo

El primer paso fue conocer si tanto el Grupo Control como el Grupo ELA eran iguales al inicio del estudio. Teniendo en cuenta el día PRE, todas las intensidades, ambas extremidades y ambos Grupos, se realizó un ANOVA MMRR que mostró que no existían diferencias en función del Grupo [$F(1, 15)=0,309$, $p= 0.587$]. Todo esto nos indicaba como se mencionaba anteriormente, que ambos Grupos eran iguales al inicio, lo que evitaba la necesidad de realizar una normalización de los datos.

La FIGURA 55 muestra los resultados de ambos Grupos. En ambos Grupos se observa de forma general, cómo el perfil de reclutamiento de la onda M comienza primero aumentando de forma progresiva en las intensidades bajas; tras el aumento progresivo de la intensidad, la amplitud de la onda comienza una fase de crecimiento exponencial hasta que, a intensidades altas, se produce una estabilización de la amplitud de la onda, indicando que se alcanza el máximo de unidades motoras que se pueden reclutar en la localización de registro.

Los resultados intra-grupo indicaron que, si se tomaba cada extremidad como un individuo independiente, no había diferencias significativas a lo largo de los días. En el Grupo Control se muestra que la amplitud de la onda M no varía de forma significativa a lo largo de los días, lo que es indicativo de que estos animales no presentan daño neuronal debido a que la magnitud de las respuestas musculares no cambia, reclutando y activando todo el *pool* neuronal presente conforme aumenta la estimulación.

Por su parte, en el Grupo ELA, a pesar de que no existen diferencias intra-grupo a lo largo de los días, sí que se observan tendencias diferentes al Grupo Control. Se produce un aumento de la amplitud en el día 3 post implantación, sin embargo, este aumento de la amplitud no se mantiene y se produce en los siguientes días un descenso progresivo de la amplitud, viéndose éste incrementado el último día del estudio. El incremento inicial de la amplitud puede ser debido a un mecanismo compensatorio provocado por la afectación cortical, ya que el LCR se aplica intraventricularmente. Sin embargo, a pesar de este aumento de excitabilidad espinal durante los primeros días del estudio, se observa afectación cuando se intenta optimizar la activación neuronal, lo cual es indicativo de muerte neuronal, ya que no es posible reclutar al máximo, como sucedía en el Grupo Control causando el descenso en la amplitud de la onda M.

Por otro lado, era interesante conocer si al tener en cuenta las extremidades existiría alguna diferencia entre los Grupos (FIGURA 55), por ello, se realizó un ANOVA MMRR para ver si existían diferencias entre los Grupos teniendo en cuenta ambas extremidades, todos los días y todas las intensidades. Globalmente, no se encontraron diferencias entre los Grupos [$F(1, 13)=0,301, p=0,592$], tampoco se encontraron diferencias globales en la interacción cuádruple Día-Extremidad-Intensidad-Grupo [$F(56, 728)=0,839, p=0,793$]. A pesar de no existir un efecto global, se realizaron las pruebas *post hoc* corregidas por la prueba de Bonferroni. En este caso no se observó, al igual que sucedía globalmente, ningún valor significativamente diferente.

Intensidades Onda M Modelo Agudo

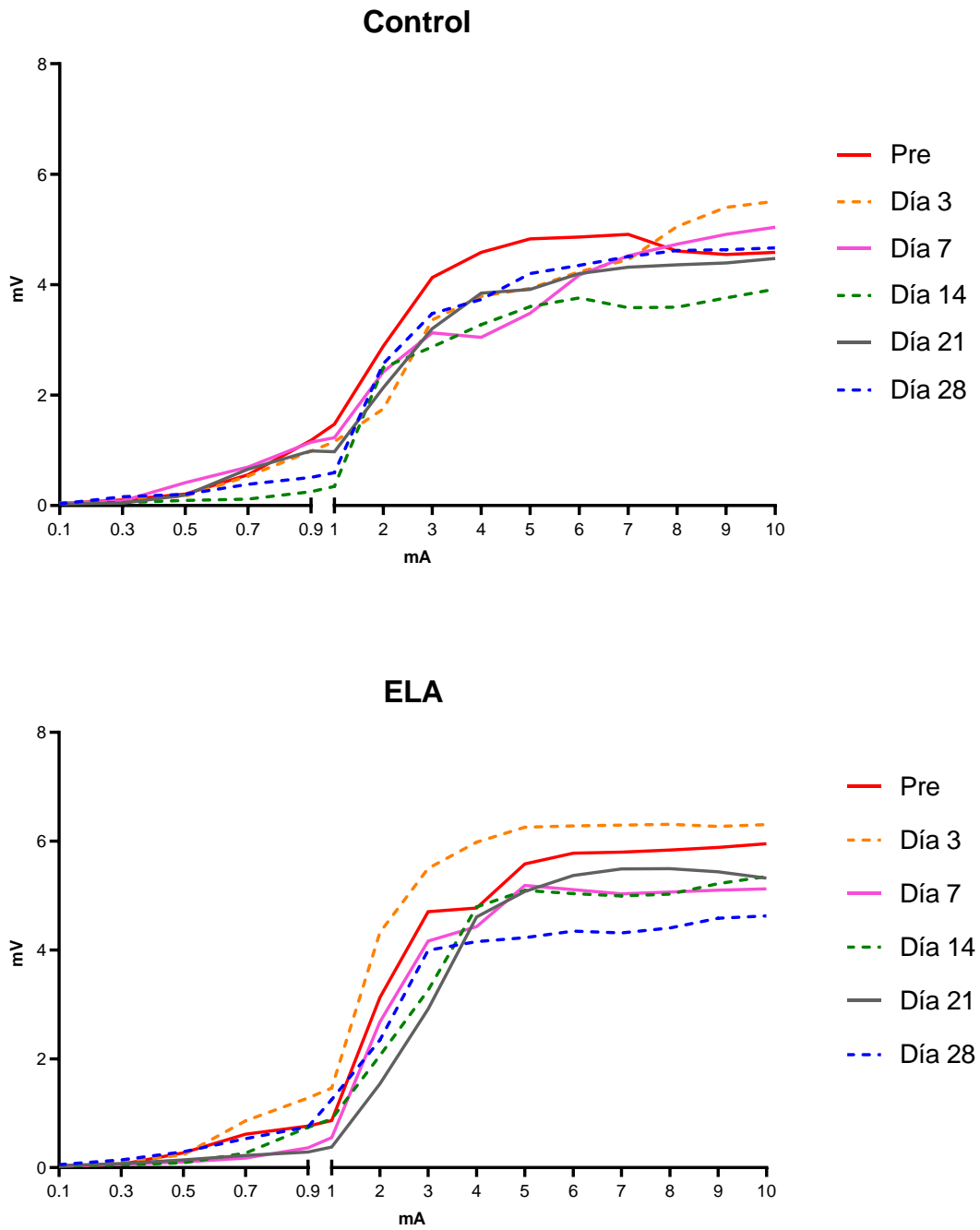


Figura 55: Resultados electrofisiológicos de la Onda M en el protocolo de intensidades del Modelo Agudo. Se muestran los promedios de las curvas de reclutamiento de la onda a lo largo de todo el estudio.

Al igual que sucedía en la onda M, en la onda H se realizó una comparación en el día de inicio de ambos Grupos. Es por ello que teniendo en cuenta todas las intensidades, ambas extremidades y ambos Grupos, se realizó un ANOVA MMRR que mostró que no existían diferencias en función del Grupo [$F(1, 14)=1,247$, $p= 0.283$]. Esto nos indica, como se mencionaba anteriormente, que ambos Grupos son iguales al inicio, lo que evita la necesidad de realizar una normalización de los datos.

La FIGURA 56 muestra los resultados de ambos Grupos tomando cada extremidad de cada animal como un individuo independiente. En ambos Grupos se observa, de forma general, como la amplitud de la onda H comienza primero aumentando de forma progresiva, posteriormente, al aumentar la intensidad, comienza una fase de crecimiento exponencial hasta que, a intensidades altas, se produce una estabilización de la amplitud de la onda.

A pesar de que la amplitud de las ondas sigue este patrón mencionado a lo largo de todos los días del estudio, en el Grupo Control se muestra que la amplitud de la onda H no varía de forma significativa a lo largo de los días, lo que es indicativo, al igual que sucedía en la onda M, de que estos animales no presentan daño neuronal debido a que son capaces, conforme aumenta la estimulación, de reclutar y activar todo el *pool* neuronal presente.

Por su parte, en el Grupo ELA a pesar de no ser significativo, observamos a intensidades altas, es decir, cuando se recluta el máximo de neuronas, un descenso de la amplitud en los primeros días del estudio, sin embargo, este descenso de la amplitud no se mantiene y se produce en los siguientes días, un aumento progresivo de la amplitud. El incremento producido en los últimos días puede estar relacionado con el intento de estos animales de activar un mecanismo compensatorio que ayude a revertir la muerte neuronal que está sucediendo.

Estadísticamente, se realizó un ANOVA MMRR para ver si existían diferencias entre los Grupos teniendo en cuenta ambas extremidades, todos los días y todas las intensidades. Globalmente, no se encontraron diferencias entre los Grupos [$F(1, 12)=2,070$, $p=0,176$], tampoco se encontraron diferencias globales en la interacción cuádruple Día-Extremidad-Intensidad-Grupo [$F(56, 672)=1,126$, $p=0,252$].

A pesar de no existir un efecto global, se realizaron las pruebas *post hoc* corregidas por la prueba de Bonferroni. Al analizar la interacción cuádruple, se encontraron diferencias significativas en ambas extremidades. En la extremidad derecha las diferencias fueron en el día 7, en las intensidades 4 ($p=0,042$) y 5 ($p=0,048$), así como en el día 14, en las intensidades 0,3 ($p<0,001$) y 0,5 ($p<0,001$). En cuanto a la extremidad izquierda, se encontraron diferencias en el día 14, en las intensidades 0,3 ($p=0,015$), 0,5 ($p=0,013$), 0,7 ($p=0,024$) y 0,9 ($p=0,016$).

Intensidades Onda H Modelo Agudo

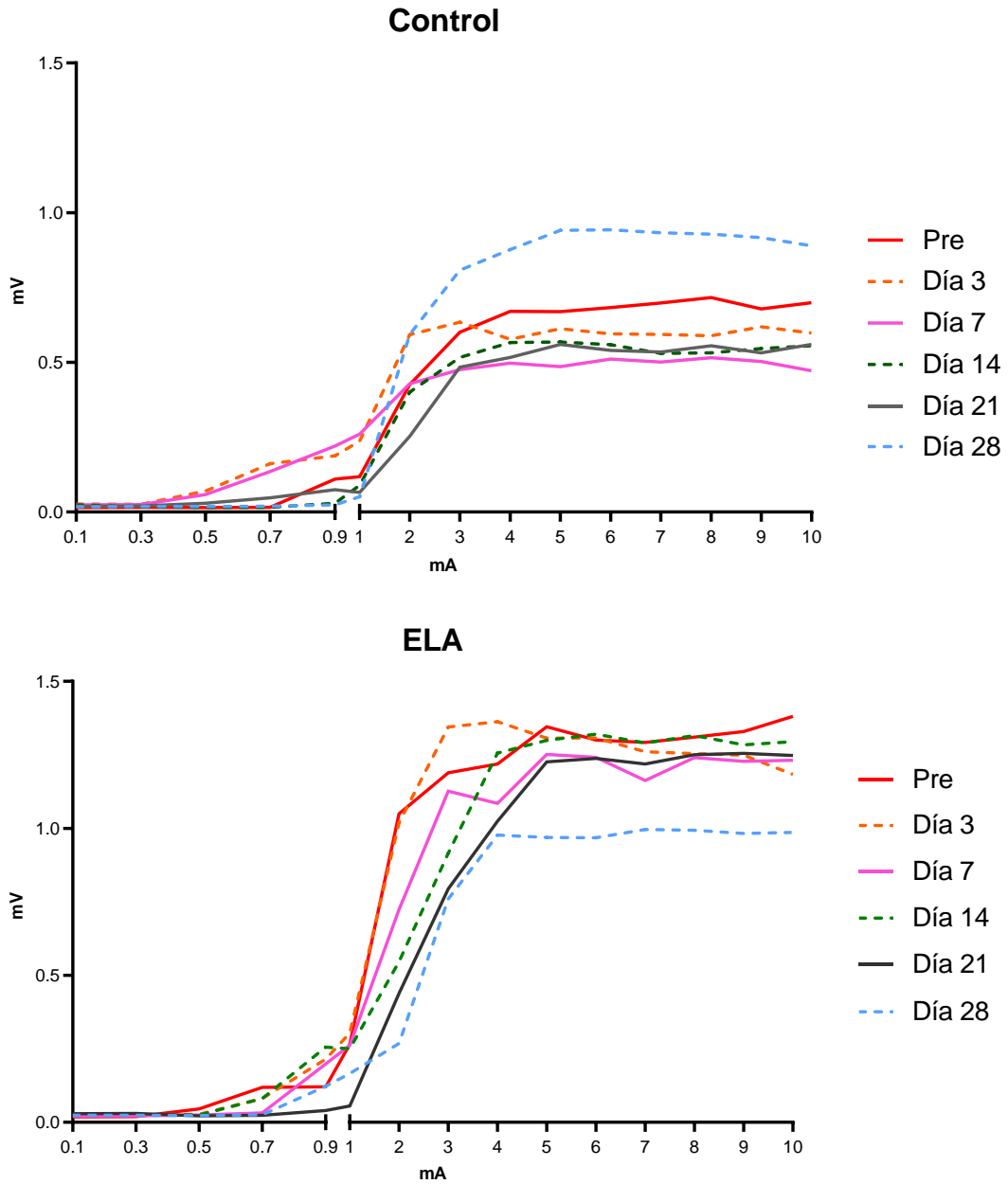


Figura 56: Resultados electrofisiológicos de la Onda H en el protocolo de intensidades del Modelo Agudo. Se muestran los promedios de las curvas de reclutamiento de la onda a lo largo de todo el estudio.

Tal y como se realizó en el protocolo de intensidades, lo primero que se comprobó en el protocolo de frecuencias fue si ambos Grupos eran iguales al inicio. Para ello, se realizó un ANOVA MMRR teniendo en cuenta todas las frecuencias, ambas extremidades y ambos Grupos. Los resultados mostraron que no existen diferencias entre los Grupos previo a la cirugía [F(1, 15)=1,072, p=0,317].

En la FIGURA 57 se pueden observar que los resultados intra-grupo fueron los siguientes:

En el Grupo Control se observa como la amplitud desciende conforme aumenta la frecuencia de forma progresiva. En cuanto a los días, se produce un aumento de las amplitudes al inicio del estudio que posteriormente disminuye hasta colocarse en niveles mínimos a mitad del estudio, posteriormente se produce un nuevo aumento para finalizar las amplitudes por debajo del día basal.

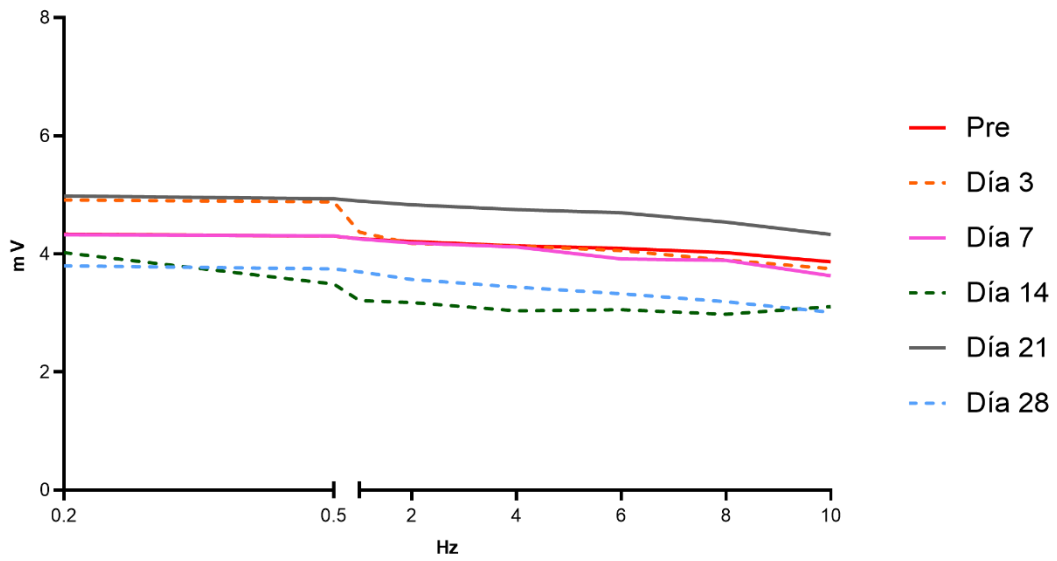
El Grupo ELA presenta un descenso progresivo en los primeros días, sin embargo, este descenso es más acusado en las frecuencias más altas, este descenso ocurre en paralelo a lo largo de todos los días, lo cual es indicativo de que las sinapsis no se ven afectadas sino de que existe una muerte de motoneuronas. En cuanto a la evolución respecto a los días, también en la FIGURA 57, se puede observar cómo existe un aumento en el día 3 post quirúrgico, este aumento de las amplitudes desaparece, convirtiéndose en un descenso progresivo hasta el final del estudio.

Estadísticamente, se realizó un ANOVA MMRR para ver si existían diferencias entre los Grupos teniendo en cuenta ambas extremidades, todos los días y todas las frecuencias. Globalmente, no se encontraron diferencias entre los Grupos [F(1, 14)=0,865, p=0,368], tampoco se encontraron diferencias globales en la interacción cuádruple Día-Extremidad-Frecuencia-Grupo [F(28, 392)=0,760, p=0,808].

A pesar de no existir un efecto global, se realizaron las pruebas *post hoc* corregidas por la prueba de Bonferroni. En este caso no se observó, al igual que sucedía globalmente, ningún valor significativamente diferente.

Frecuencias Onda M Modelo Agudo

Control



ELA

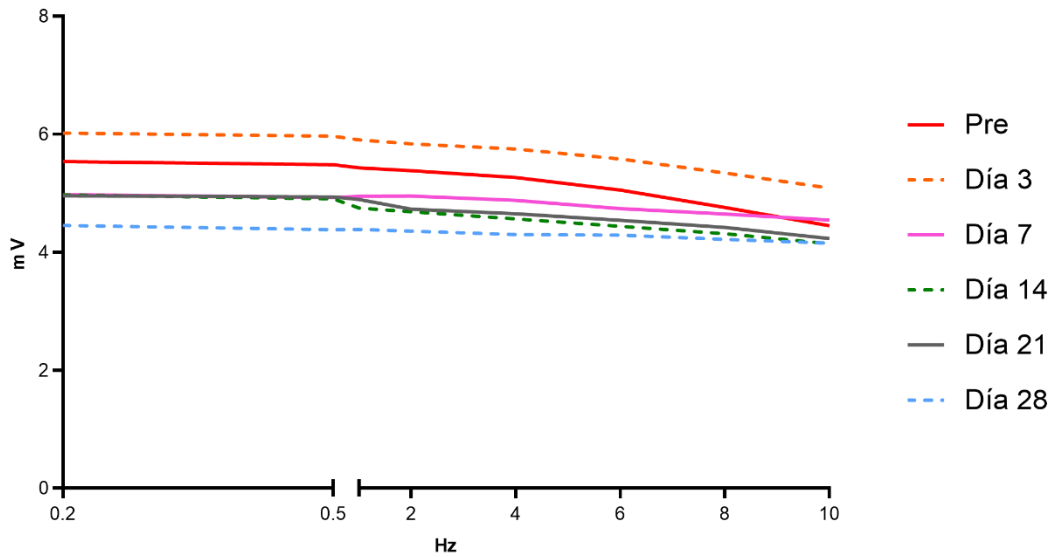


Figura 57: Resultados electrofisiológicos de la Onda M en el protocolo de frecuencias del Modelo Agudo. Se muestran los promedios de la evolución de la onda a lo largo de todo el estudio.

Al realizar un ANOVA MMRR teniendo en cuenta todas las frecuencias, ambas extremidades y ambos Grupos, los resultados mostraron que no existen diferencias entre los Grupos en el día basal [$F(1, 14)=1,038, p=0,326$].

Las amplitudes de la onda H descienden de forma más acusada de lo que sucedía en la onda M, esto es debido a que la onda M no depende de las sinapsis espinales, algo que sí sucede con la onda H ya que este reflejo depende de dichas sinapsis.

En el Grupo Control se observa cómo la amplitud desciende, conforme aumenta la frecuencia, de forma más acusada con las frecuencias más altas. En cuanto a los días, se produce un descenso de las amplitudes al inicio del estudio, este descenso se ve reducido en los últimos días del estudio, hasta situarse en valores por encima del basal en el último día del estudio (FIGURA 58).

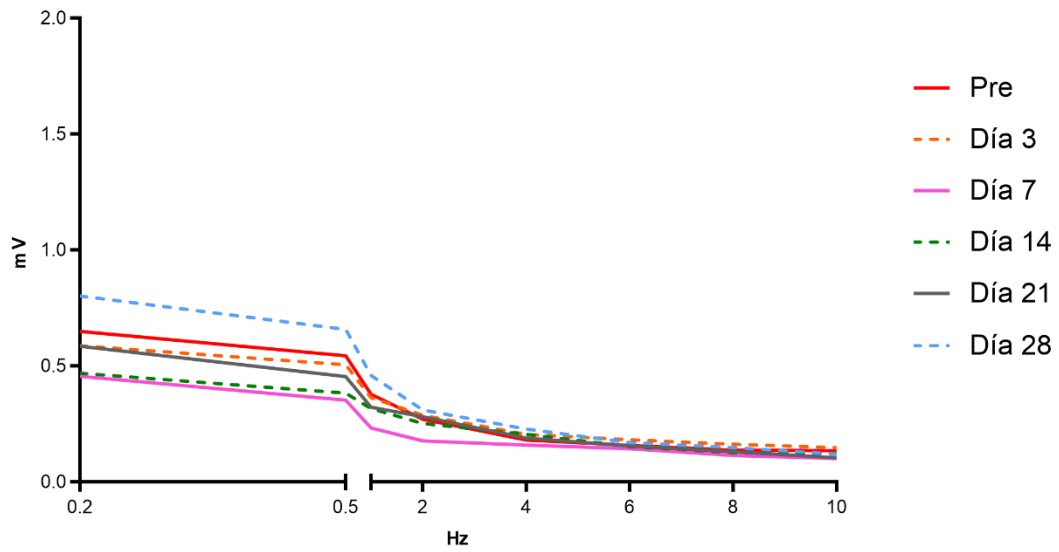
El Grupo ELA presenta un descenso progresivo en las frecuencias bajas y más acusado en las frecuencias más altas, este descenso ocurre en paralelo a lo largo de todos los días, lo cual es indicativo de que las sinapsis no se ven afectadas, sino de que existe una muerte de motoneuronas. En cuanto a la evolución respecto a los días, en la FIGURA 58 se puede observar cómo existe un descenso ligero a lo largo de todos los días del estudio.

Estadísticamente, se realizó un ANOVA MMRR para ver si existían diferencias entre los Grupos teniendo en cuenta ambas extremidades, todos los días y todas las frecuencias. Globalmente, no se encontraron diferencias entre los Grupos [$F(1, 12)=1,647, p=0,224$], tampoco se encuentran diferencias globales en la interacción cuádruple Día-Extremidad-Frecuencia-Grupo [$F(28, 336)=0,748, p=0,821$].

A pesar de no existir un efecto global, se realizaron las pruebas *post hoc* corregidas por la prueba de Bonferroni. Al analizar la interacción cuádruple, se encontraron diferencias significativas en la extremidad derecha. Concretamente las diferencias se encontraron en el día 7, en las frecuencias 4 ($p=0,033$), 6 ($p=0,045$), 8 ($p=0,042$) y 10 ($p=0,043$).

Frecuencias Onda H Modelo Agudo

Control



ELA

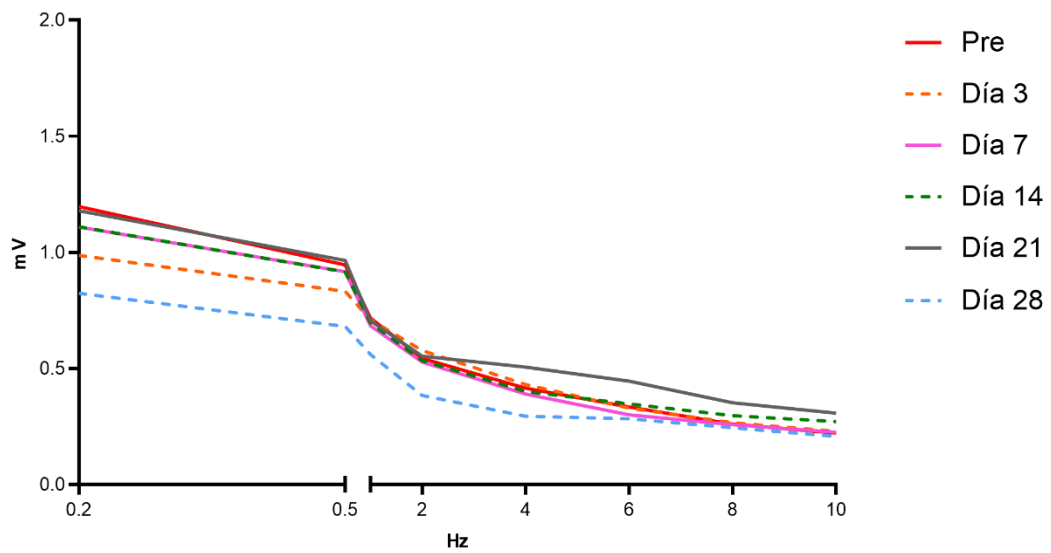


Figura 58: Resultados electrofisiológicos de la Onda H en el protocolo de frecuencias del Modelo Agudo. Se muestran los promedios de la evolución de la onda a lo largo de todo el estudio.

Modelo Crónico

Intensidades Onda M Modelo Crónico

Al igual que en el Modelo Agudo, es importante conocer si todos los Grupos son iguales en el inicio del estudio, ya que si no lo fueran deberíamos realizar una normalización de los datos. Se realizó un ANOVA MMRR teniendo en cuenta el día basal, las dos extremidades y todas las intensidades, resultando que todos los Grupos eran iguales [$F(2, 12)=2,136, p=0,161$].

El perfil de reclutamiento general de la onda M es el siguiente: cuando se comienza a estimular el músculo a intensidades bajas no se produce respuesta alguna, hasta que se llega a una intensidad umbral a la cual comienza a aumentar la amplitud de la onda de forma progresiva. Al continuar estimulando a intensidades progresivamente más altas, la amplitud de la onda entra en una fase de crecimiento exponencial, hasta que, a intensidades altas, la amplitud se estabiliza.

A pesar de que este es el perfil de reclutamiento de la onda de forma general, existen ciertas diferencias en los perfiles que siguen los Grupos a lo largo de los días, sin embargo, estas diferencias no son estadísticamente significativas (FIGURA 59). En el Grupo Control se observa un aumento de las amplitudes en los primeros días, provocado por una hiperexcitabilidad espinal como consecuencia del deterioro cortical y del consecuente mecanismo de compensación, sin embargo, a partir del día 28 se produce un descenso de las amplitudes, debido al deterioro progresivo de las motoneuronas de la médula espinal, siendo las amplitudes menores que las del día basal. En el Grupo No Citotóxico se observa un aumento de las amplitudes de la onda M conforme evolucionan las semanas, salvo en el día 28, que se produce un descenso de la amplitud recuperándose posteriormente a los niveles de días anteriores, siendo estas amplitudes mayores que el día basal, indicando un aumento de hiperexcitabilidad de las motoneuronas. Por último, el Grupo Citotóxico posee un perfil muy similar al No Citotóxico, con la salvedad de que en el día 7 se produce un aumento mayor de las amplitudes de la onda M, que posteriormente vuelve a descender.

Con el dato de que los 3 Grupos eran iguales al inicio, se procedió a realizar el análisis del resto de los días sin la necesidad de normalización. Se realizó un ANOVA MMRR y los resultados indicaron que no existía diferencias entre los Grupos [$F(2, 12)=0,444$, $p=0,652$], sin embargo, se encontraron diferencias significativas en la interacción cuádruple Día-Extremidad-Intensidad-Grupo [$F(224, 1344)=1,189$, $p=0,040$]. Este resultado nos llevó a realizar un análisis *post hoc* corregido por la prueba de Bonferroni, que indicaron que las diferencias se encontraban en la extremidad izquierda, y los Grupos ELA-No Citotóxico y ELA-Citotóxico, en el día 7 e intensidad 2 ($p=0,01$), y en el día 14 en las intensidades más bajas 0,1 ($p=0,016$), 0,3 ($p=0,012$) y 0,5 ($p=0,009$).

Intensidades Onda M Modelo Crónico

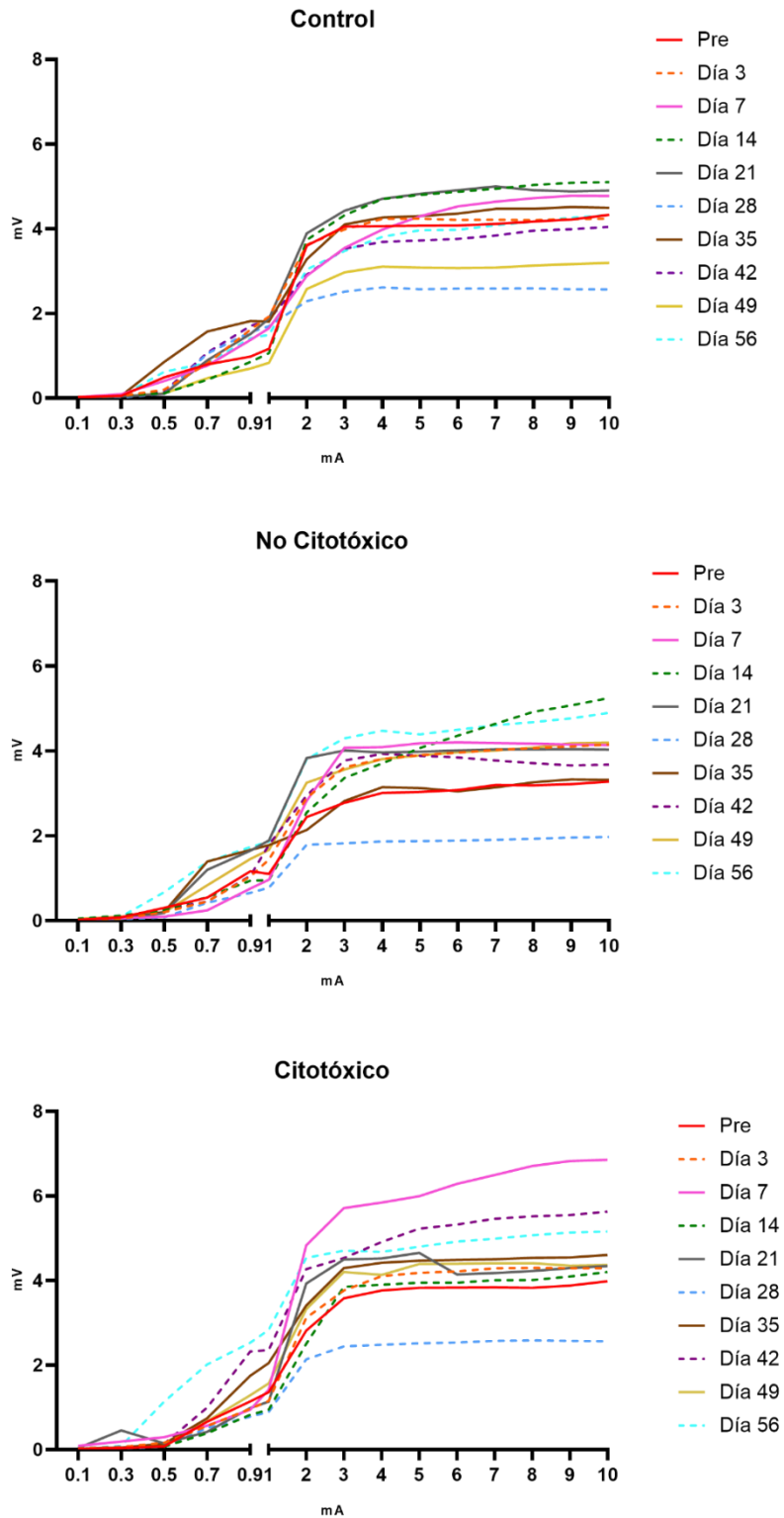


Figura 59: Resultados electrofisiológicos de la Onda M en el protocolo de intensidades del Modelo Crónico. Se muestran los promedios de las curvas de reclutamiento de la onda a lo largo de todo el estudio.

El ANOVA MMRR del día basal, para las dos extremidades y todas las intensidades indicaba que todos los Grupos eran iguales [$F(2, 12)=1,578, p=0,246$].

El perfil de reclutamiento general de la onda H es el siguiente: cuando se comienza a estimular el músculo a intensidades bajas no se produce respuesta alguna hasta que se llega a una intensidad umbral, a la cual comienza a aumentar la amplitud de la onda de forma progresiva. Al continuar estimulando con un incremento progresivo de las intensidades, la amplitud de la onda entra en una fase de crecimiento exponencial hasta que, a intensidades más altas, la amplitud se estabiliza.

A pesar de que este es el perfil de reclutamiento de la onda de forma general, existen ciertas diferencias en los perfiles que siguen los Grupos a lo largo de los días, sin embargo, estas diferencias no son estadísticamente significativas. En todos los Grupos se observa de forma general, cómo las amplitudes de las ondas aumentan con el paso del tiempo, situándose siempre por encima del día basal. En el Grupo Control se observa un aumento progresivo de las amplitudes a lo largo de todos los días, hasta el día 42 ya que, en los días posteriores, cuando ya no existe flujo de LCR, se produce un descenso de las amplitudes. Por su parte, en el Grupo No Citotóxico se observa un aumento de las amplitudes de la onda H a lo largo de todos los días. Por último, el Grupo Citotóxico muestra mayor número de fluctuaciones en cuanto a la amplitud, no produciéndose ese aumento progresivo observado en los Grupos anteriores, sino que las amplitudes aumentan y disminuyen según el momento del estudio, además de que estas amplitudes, aunque no son diferentes estadísticamente, sí son menores y menos estables que en los dos Grupos anteriores (FIGURA 60).

Con el dato de que los tres Grupos eran iguales al inicio, se procedió a realizar el análisis del resto de los días sin la necesidad de normalización. Se realizó un ANOVA MMRR y los resultados indicaron que no existía diferencias entre los Grupos [$F(2, 12)=1,318$, $p=0,304$], sin embargo, se encontraron diferencias significativas en la interacción cuádruple Día-Extremidad-Intensidad-Grupo [$F(224, 1344)=1,560$, $p<0,0001$]. Este resultado nos llevó a realizar un análisis *post hoc* corregidas por la prueba de Bonferroni, que indicaron que las diferencias se encontraban en ambas extremidades. En la extremidad derecha las diferencias ocurrieron entre el Grupo Control y ELA-Citotóxico, en el día 14 en las intensidades bajas 0,5 ($p=0,027$) y 1 ($p=0,046$), y entre los Grupos ELA-No Citotóxico y ELA-Citotóxico, los días 35 en la intensidad 0,3 ($p=0,033$) y 42 en las intensidades 0,9 ($p=0,035$) y 1 ($p=0,045$). Por su parte, la extremidad izquierda presenta diferencias estadísticas entre los Grupos Control y ELA-Citotóxico, en el día 7 en la intensidad 8 ($p=0,046$), en el día 21 en las intensidades 2 ($p=0,038$), 4 ($p=0,034$), 5 ($p=0,047$), 6 ($p=0,045$), y 8 ($p=0,034$), y en el día 42 en las intensidades 3 ($p=0,009$), 4 ($p=0,004$), 5 ($p=0,004$), 6 ($p=0,006$), 7 ($p=0,007$), 8 ($p=0,005$), 9 ($p=0,008$), y 10 ($p=0,011$). También se encontraron diferencias significativas entre los Grupos Control y ELA-No Citotóxico en el día 42 en las intensidades 4 ($p=0,019$), 5 ($p=0,02$), 6 ($p=0,021$), 7 ($p=0,023$), 8 ($p=0,014$), 9 ($p=0,026$), y 10 ($p=0,023$).

Intensidades Onda H Modelo Crónico

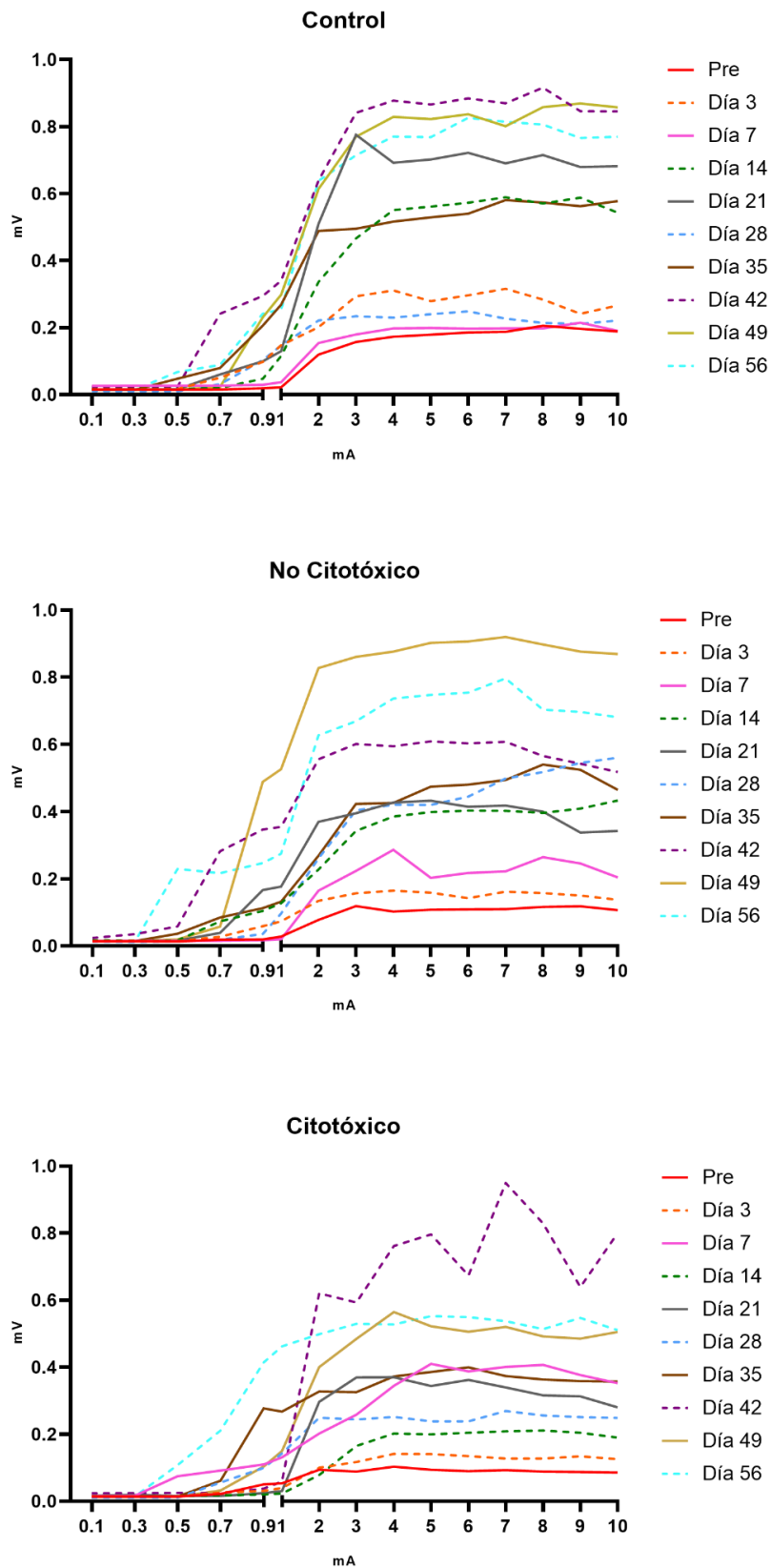


Figura 60: Resultados electrofisiológicos de la Onda H en el protocolo de intensidades del Modelo Crónico. Se muestran los promedios de las curvas de reclutamiento de la onda a lo largo de todo el estudio.

Al igual que en el resto de protocolos, se realizó un ANOVA MMRR teniendo en cuenta el día basal, las dos extremidades y todas las frecuencias, y a diferencia de lo ocurrido en todos los casos anteriores, en este protocolo sí se encontraron diferencias significativas entre los Grupos al inicio del estudio [$F(2, 12)=5,374, p=0,022$]. Lo que conllevó la necesidad de realizar una normalización de los datos para poder compararlos entre sí. Para ello, se tomó la media de cada intensidad en el día basal. Todos los datos fueron divididos por la media correspondiente para normalizarse.

De forma general en el protocolo de frecuencias la onda M, como el músculo es estimulado a una intensidad alta, presenta una amplitud grande que disminuye de forma progresiva conforme se estimula a mayores frecuencias. Todas las ondas, a lo largo del estudio, presentan este perfil de descenso progresivo de la amplitud con respecto a la frecuencia, sin embargo, existen diferencias dentro de cada Grupo, que, a pesar de no ser significativas, sí resultan interesantes porque los distintos Grupos presentan perfiles diferentes a lo largo de los días. En el Grupo Control se observa un descenso progresivo de las amplitudes conforme evolucionan los días, salvo en los días 14 y 21 que presentan un ligero aumento, que en los días posteriores desaparece, volviendo a disminuir estas amplitudes. En el Grupo No Citotóxico se observa un aumento de las amplitudes de la onda M con respecto al día basal, sin embargo, a pesar de este aumento, las amplitudes de la onda prácticamente todos los días se mantienen sin variaciones. En el Grupo Citotóxico sucede algo similar a lo que ocurren el Grupo No Citotóxico, es decir, al igual que sucedía en el otro grupo se produce un aumento de las amplitudes con respecto al día basal, siendo muy pronunciado el aumento en el día 7, sin embargo, este aumento disminuye manteniéndose las amplitudes por encima del día basal, pero en valores muy similares a este. Cabe destacar que en los tres grupos, en el día 28, se produce un descenso de las amplitudes (FIGURA 61).

Tras la normalización, se procedió a realizar el análisis del resto de los días. Se realizó un ANOVA MMRR y los resultados indicaron que existían diferencias entre los Grupos [$F(2, 12)=4,998$, $p=0,026$], sin embargo, se encontraron diferencias significativas en la interacción cuádruple Día-Extremidad-Frecuencia-Grupo [$F(112, 672)=1,550$, $p<0,0001$]. Este resultado nos llevó a realizar un análisis *post hoc* corregidas por la prueba de Bonferroni, que indicaron que las diferencias se encontraban en ambas extremidades. En la extremidad derecha las diferencias ocurrieron entre el Grupo Control y ELA-No Citotóxico en el día 42 para las frecuencias bajas 0,2 ($p=0,041$), en las frecuencias medias 2 ($p=0,041$) y 3 ($p=0,043$), y entre los Grupos ELA-No Citotóxico y ELA-Citotóxico en el día 42, en las frecuencias 0,2 ($p=0,049$), 2 ($p=0,035$), 3 ($p=0,036$) y 4 ($p=0,045$). Por su parte la extremidad izquierda presenta diferencias estadísticas entre los Grupos Control y ELA-Citotóxico en el día 3 en las frecuencias 0,2 ($p=0,047$) y 10 ($p=0,049$).

Frecuencias Onda M Modelo Crónico

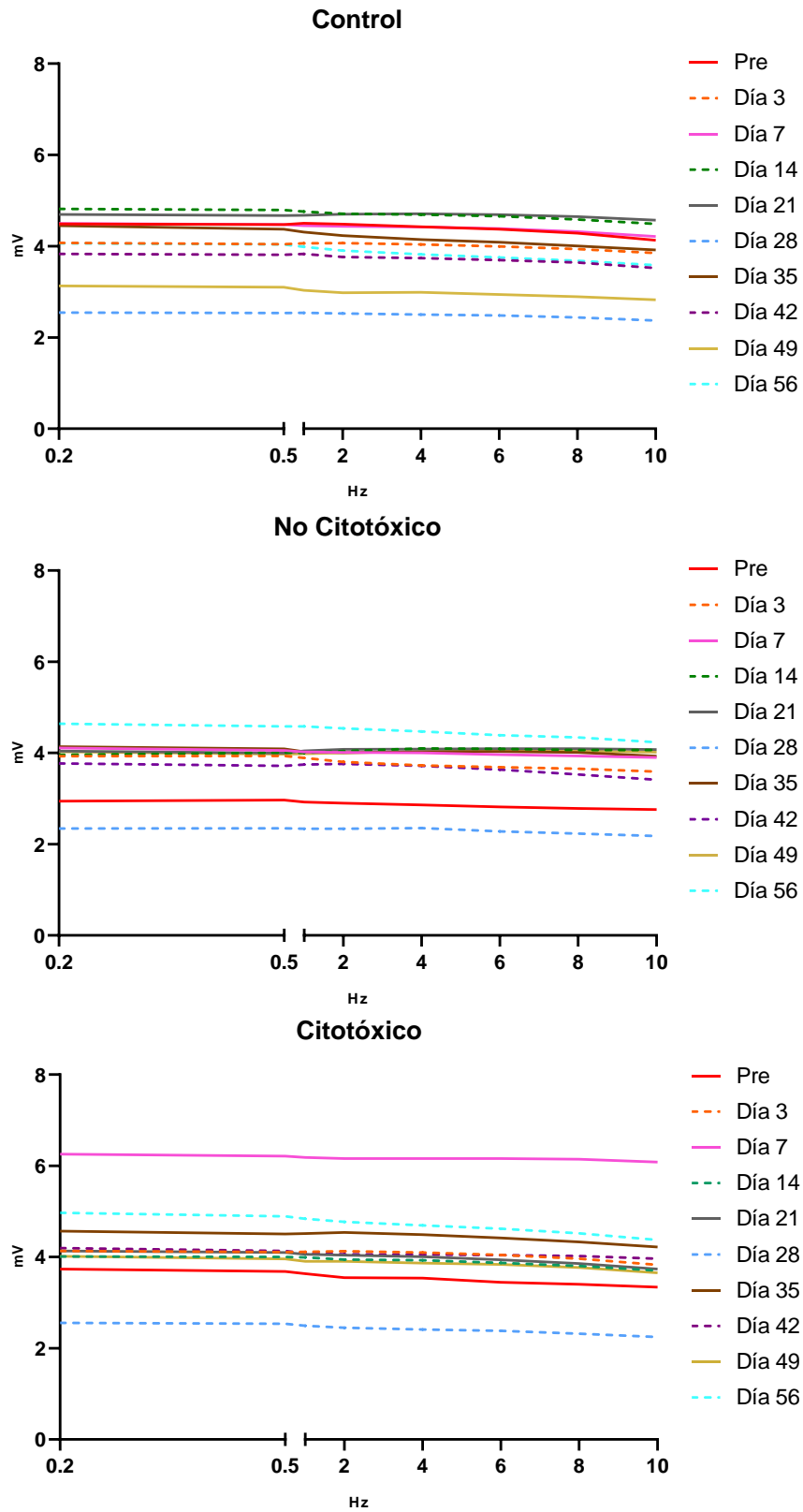


Figura 61: Resultados electrofisiológicos de la Onda M en el protocolo de frecuencias del Modelo Crónico. Se muestran los promedios de la evolución de la onda a lo largo de todo el estudio.

Al realizar el ANOVA MMRR teniendo en cuenta el día basal, las dos extremidades y todas las frecuencias, se encontraron diferencias significativas entre los Grupos al inicio del estudio [$F(2, 12)=7,247, p=0,009$]. Lo que supuso la necesidad de realizar una normalización de los datos para poder compararlos entre sí. Para ello, se tomó la media de cada intensidad en el día basal. Todos los datos fueron divididos por la media correspondiente para normalizarse.

La onda H al estar relacionada con las sinapsis en la médula espinal, se ve influenciada de mayor forma por las frecuencias, de ahí que el descenso de la onda se produzca de forma muy evidente al aumentar la frecuencia, a diferencia de lo que sucedía en la onda M, donde el descenso de la amplitud con respecto al aumento de frecuencia era menor y muy progresivo.

En cuanto a las diferencias intra-grupo, encontramos que dentro del Grupo Control se observa que las amplitudes aumentan respecto al basal a lo largo de los días, encontrando su máximo en el día 42; en cuanto a las frecuencias más altas, todas las amplitudes de la onda H muestran unos valores muy similares. En el Grupo No Citotóxico, también los últimos días, presentan amplitudes más altas, sin embargo, el descenso en estos días con respecto a la frecuencia se produce de forma mucho más brusca que en los primeros días donde las amplitudes, aunque disminuyen, se mantienen similares a lo largo de todas las frecuencias. En cuanto al Grupo Citotóxico, las amplitudes de la onda a lo largo de todos los días son menores que en los otros Grupos, y en las frecuencias más altas las amplitudes son mucho más similares a la de los otros Grupos (FIGURA 62).

Tras la normalización, se procedió a realizar el análisis del resto de los días sin la necesidad de normalización. Se realizó un ANOVA MMRR y los resultados indicaron que no existían diferencias entre los Grupos [$F(2, 12)=0,505, p=0,616$], sin embargo, se encontraron diferencias significativas en la interacción cuádruple Día-Extremidad-Frecuencia-Grupo [$F(112, 672)=1,461, p=0,0003$]. Este resultado nos llevó a realizar un análisis *post hoc* corregidas por la prueba de Bonferroni, que indicaron que las diferencias se encontraban en ambas extremidades. En la extremidad derecha, las diferencias ocurrieron entre los Grupos ELA-No Citotóxico y ELA-Citotóxico en el día 28 en las frecuencias 1 ($p=0,013$), 2 ($p=0,03$), y en el día 35 en las frecuencias 2 ($p=0,024$) y 3 ($p=0,025$). Por su parte la extremidad izquierda presenta diferencias estadísticas entre los Grupos Control y ELA-Citotóxico en el día 3, en la frecuencia 6 ($p=0,046$) y entre los Grupos Control y ELA-No Citotóxico en el día 7, en las frecuencias 8 ($p=0,026$) y 10 ($p=0,038$) .

Frecuencias Onda H Modelo Crónico

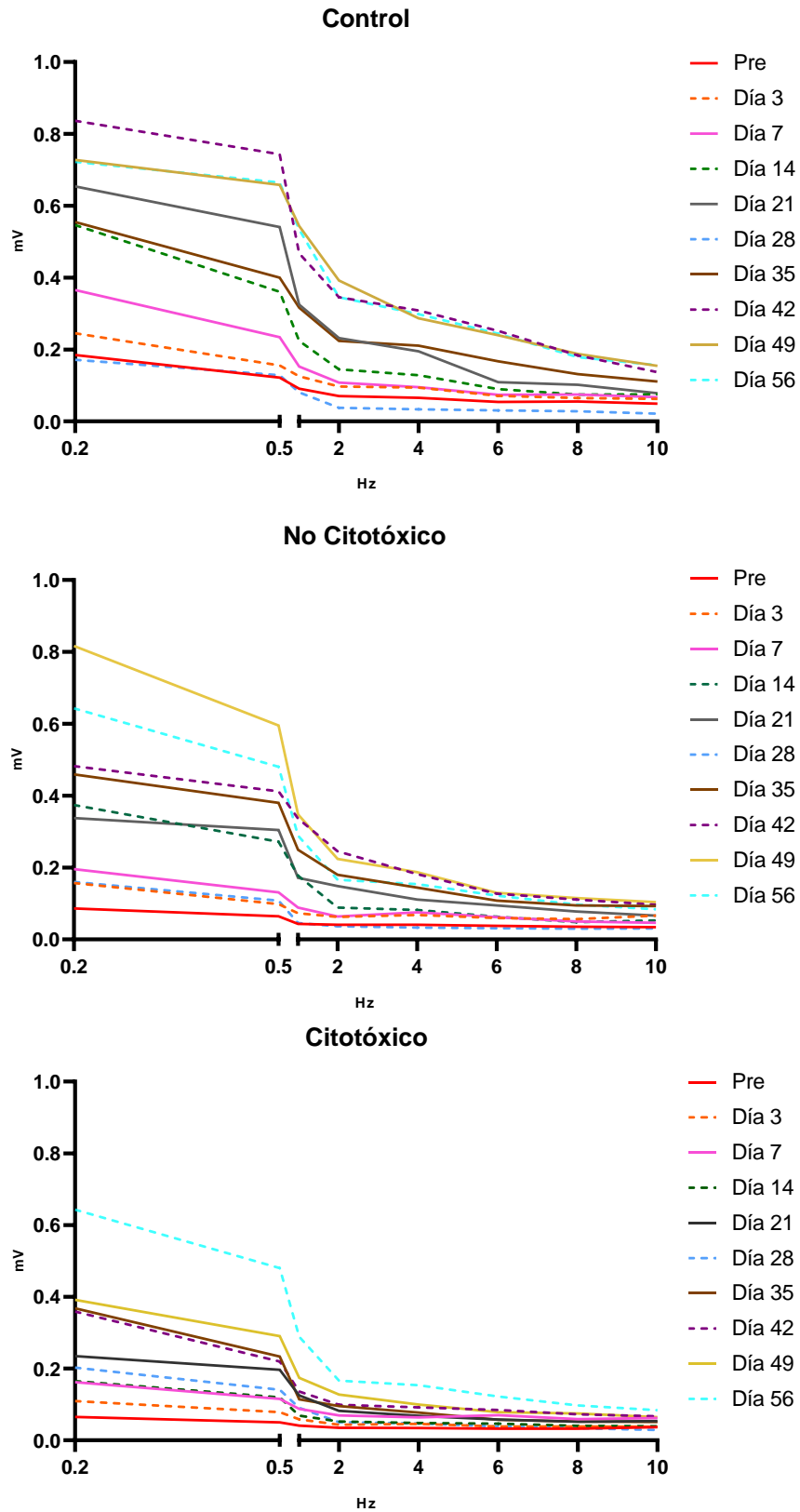


Figura 62: Resultados electrofisiológicos de la Onda H en el protocolo de frecuencias del Modelo Crónico. Se muestran los promedios de la evolución de la onda a lo largo de todo el estudio.

Variables clínicas

Peso corporal

A todos los animales se les realizó una medida del peso corporal de forma previa a la implantación de las mini-bombas osmóticas y semanalmente de forma posterior a dicho implante, hasta la finalización del estudio.

En cuanto al Modelo Agudo, algunos animales mostraron una ligera pérdida de peso al inicio del estudio, pero sin llegar a ser este descenso superior al 10% del total del peso corporal. Al realizar un ANOVA univariante (ANOVA) se comprobó que ambos Grupos no presentaban diferencias en cuanto al peso en el momento previo a la cirugía [F(1, 15)=2,269, p=0,153].

Posteriormente se realizó un ANOVA de medidas repetidas con un factor inter-sujeto (ANOVA MMRR), donde globalmente no se encontraron diferencias significativas entre los Grupos a lo largo de los días [F(4, 60)=0,823, p=0,515]. A pesar de no existir diferencias entre Grupos, se observa una tendencia ascendente del peso medio a lo largo del estudio. (FIGURA 63)

En cuanto al Modelo Crónico, algunos animales mostraron una ligera pérdida de peso a lo largo del estudio, recuperándose esta pérdida de peso en las siguientes semanas, y mostrando todos los animales un peso superior al basal en el momento de la última medida.

En primer lugar, se realizó un ANOVA donde se comprobó que ambos Grupos no presentaban diferencias en cuanto al peso en el momento previo a la cirugía [F(2, 27)=0,556, p=0,580].

Posteriormente se realizó un ANOVA MMRR donde globalmente no se encontraron diferencias significativas entre los Grupos a lo largo de los días [F(16, 216)=0,1,501, p=0,101]. A pesar de no existir diferencias entre Grupos, se observa una tendencia ascendente del peso medio a lo largo del estudio. (FIGURA 63)

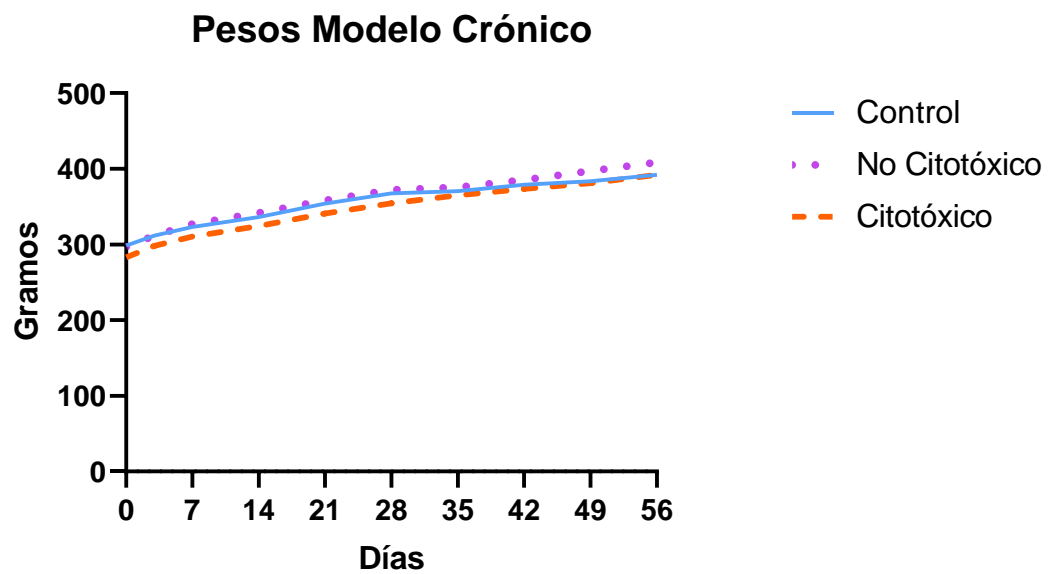
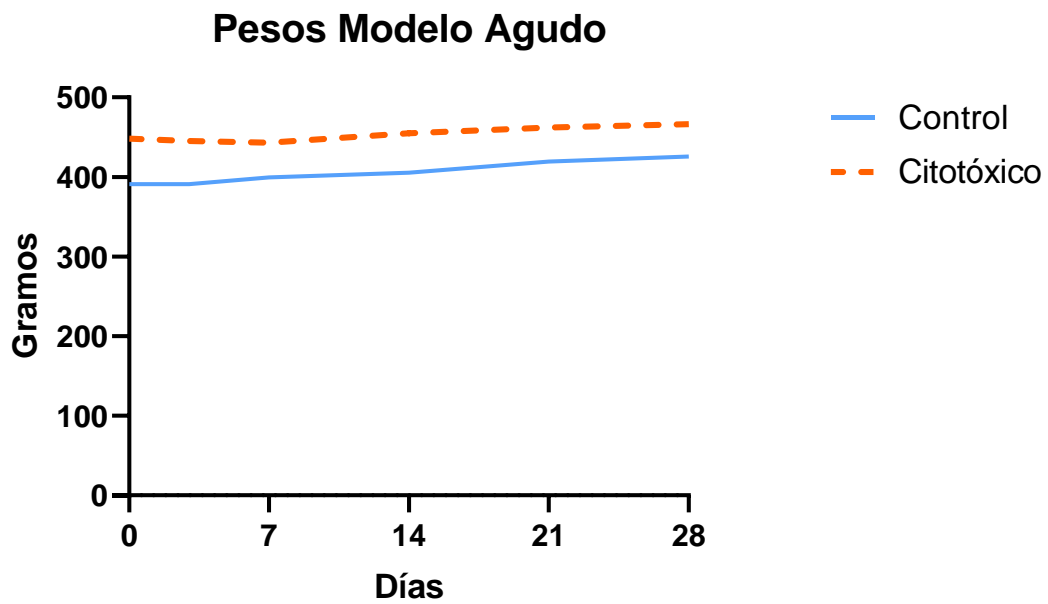


Figura 63: Evolución medio del peso de los animales de ambos modelos.

Tal y como se ha comentado en el apartado de Materiales y Métodos, a los animales del Modelo Crónico, se les realizaron el test de Matsumoto, el test del Plano Inclinado y el test *Footprint*.

Plano Inclinado

El test de Plano Inclinado determina la fuerza en las extremidades de los animales. Los animales fueron colocados lateralmente de forma perpendicular al eje mayor del plano inclinado y se evalúa el ángulo máximo al cual son capaces de mantenerse durante 5 segundos sin caerse. Este proceso se realiza colocando al animal, tanto del lado derecho como del izquierdo, para así evaluar la fuerza en ambas extremidades.

Las puntuaciones de medias entre los Grupos no mostraron diferencias significativas a lo largo del estudio, ni en las extremidades derechas ni en las izquierdas. El Grupo Control mostró una puntuación mínima media de 60° de inclinación tanto en la extremidad derecha como la izquierda y una puntuación media máxima de 63,3° en ambas extremidades. El Grupo No Citotóxico presentaba una puntuación media mínima de 59,1° en ambas extremidades y máxima de 63,3° en ambas extremidades. Por último, el Grupo Citotóxico tenía una puntuación mínima media de 59,1° en la extremidad derecha y de 60° en la izquierda, y una puntuación máxima media de 64,1° en ambas extremidades.

En primer lugar, se realizó la comprobación mediante ANOVA MMRR, de que todos los Grupos eran iguales al inicio del estudio y los resultados mostraron que en el día basal todos los Grupos eran iguales teniendo en cuenta ambas extremidades [$F(2, 15)=0,064$, $p=0,938$].

Posteriormente se procedió al análisis completo, también mediante un ANOVA MMRR, que mostró que globalmente no existían diferencias entre los Grupos al analizar las interacciones triples (Extremidad-Semana-Grupo) [$F(14, 105)=0,660$, $p=0,808$], sin embargo, al analizar de forma concreta las pruebas *post hoc*, se observan diferencias significativas tanto en la extremidad derecha como en la izquierda. En la extremidad derecha encontramos diferencias en la segunda semana entre los Grupos Control y ELA Citotóxico ($p=0,0046$), y entre los Grupos ELA No Citotóxico y ELA Citotóxico ($p=0,0046$), y en la quinta semana entre los Grupos Control y ELA no citotóxico ($p=0,0017$), y entre los Grupos ELA No Citotóxico y ELA Citotóxico ($p=0,005$). En la extremidad izquierda estas diferencias solo se encuentran en la quinta semana entre los Grupos Control y ELA No Citotóxico ($p=0,005$) y los Grupos ELA No Citotóxico y ELA Citotóxico ($p<0,001$) (FIGURA 64).

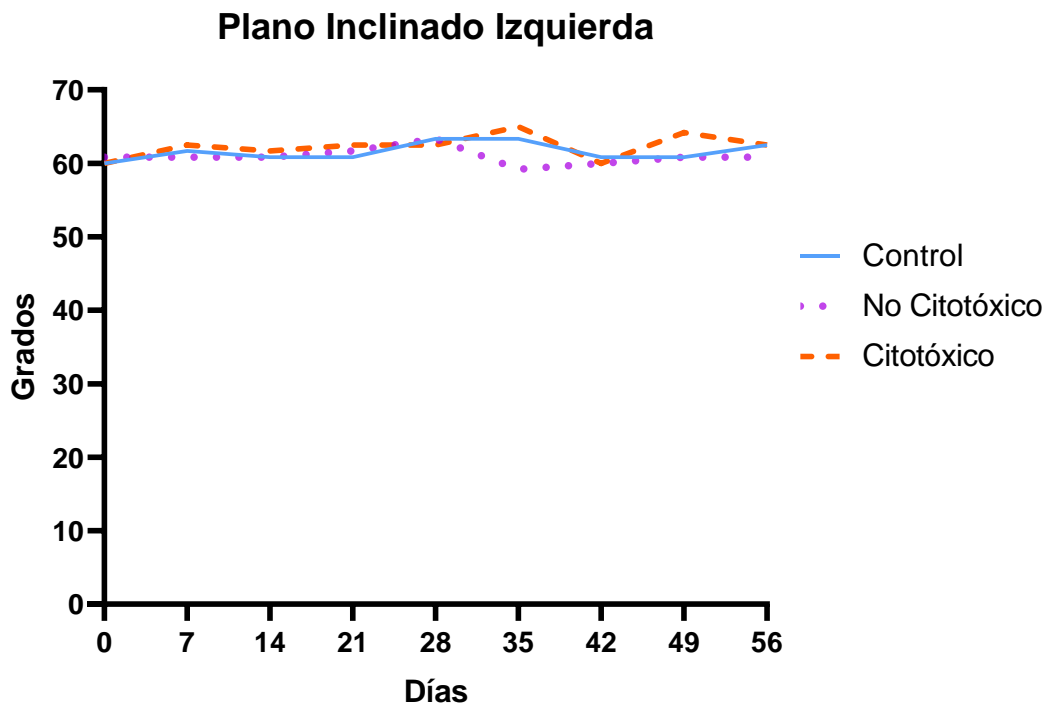
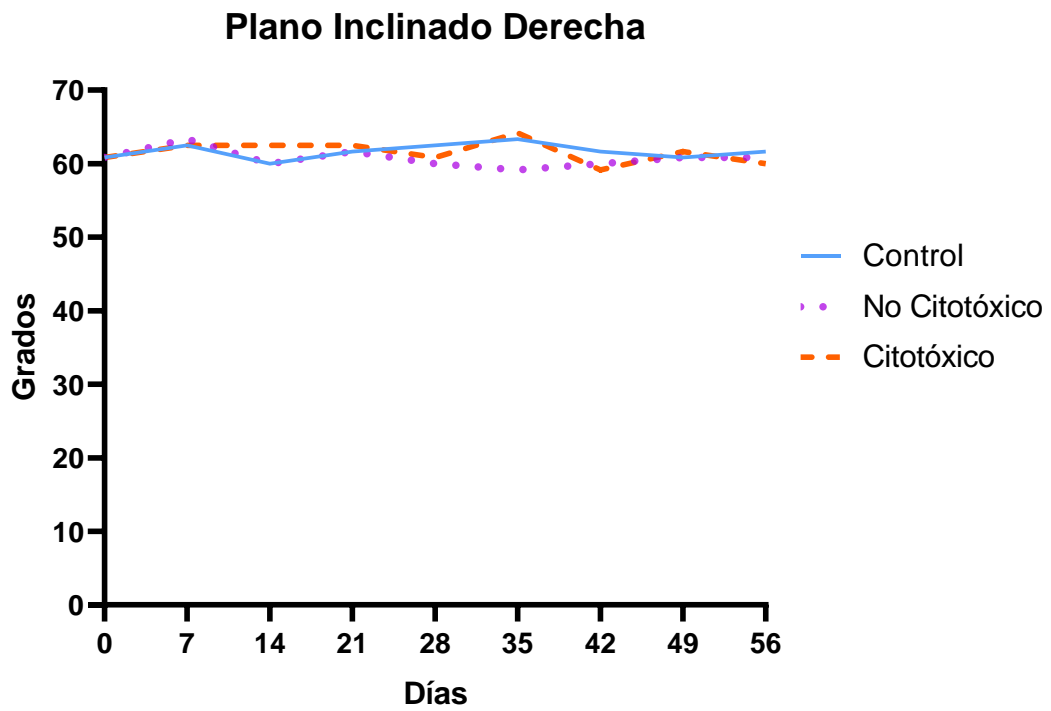


Figura 64: Resultados medios del test de Plano Inclinado dividido por extremidad.

Matsumoto

Para evaluar la función motora, se les realizó a 6 animales de cada Grupo la escala motora de Matsumoto. Los animales fueron colocados en un campo abierto y se observa durante 30 segundos si es capaz de incorporarse de ambos lados.

Todos los animales presentaron una puntuación basal de 5 en la escala, por lo que no fue necesario ninguna prueba estadística para comprobar si los Grupos eran diferentes al inicio del estudio.

Posteriormente, se realiza un ANOVA MMRR en el que globalmente no se encontraron diferencias entre los grupos a lo largo de los días [$F(14, 105)=1,298, p=0,221$]. A pesar de esto, sí se observa que los animales del Grupo con LCR-Citotóxico presentan puntuaciones medias más bajas a partir de la segunda semana, mientras que los otros dos Grupos comienzan a presentar puntuaciones menores en semanas posteriores manteniéndose siempre el Grupo Control con puntuaciones medias más altas a lo largo de todo el estudio (FIGURA 65).

Las puntuaciones más bajas se debieron a que algunos días a lo largo del estudio algunos de los animales no se levantaron en los 30 segundos correspondientes, o solo se levantaron de uno de los lados, revirtiéndose esto a la semana siguiente, salvo en uno de los animales del Grupo LCR-Citotóxico, el cual a partir de la semana 4 (día 28) y hasta el final del estudio obtuvo puntuaciones de 0.

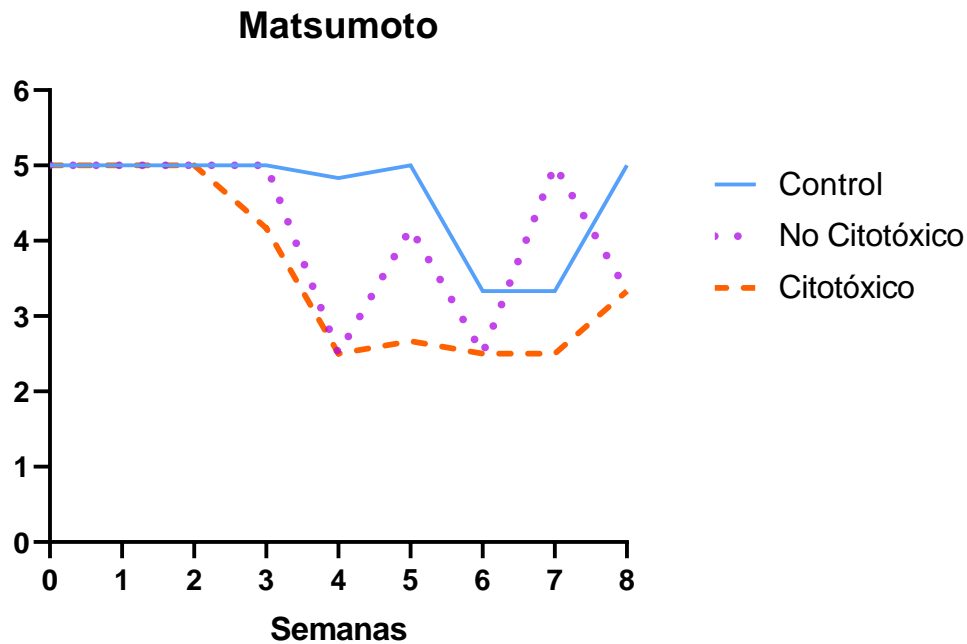


Figura 65: Resultados del Test de Matsumoto.

Sciatic Functional Index (Footprint test)

El *footprint test* se realiza para evaluar la coordinación motora, así como la sincronía. Tras el análisis de las huellas y la toma de las diversas medidas, se calcula el Sciatic Functional Index (SFI). Valores de 0 en el SFI indican una coordinación normal, mientras que valores de -100 indican una discapacidad total (285). Otros autores han determinado que los valores normales se encontraban en el rango de -11 a 11 (282). Sin embargo, se suele utilizar los valores de Sarikcioglu et al.

Con la variable TOF, se mide la capacidad de la extremidad experimental de soportar el peso del animal. Las variables TS e ITS son indicadores de la condición del nervio peroneo, y la variable PL es mejor en los animales normales que andan solo sobre los dedos, mientras que los animales con nervios lesionados apoyan todo el pie e incluso arrastran los dedos.

En primer lugar, se analizaron los resultados en el día basal mediante un ANOVA, para comprobar que todos Grupos eran iguales al inicio del estudio y se observó que no existían diferencias entre los Grupos [$F(2, 14)=0,937$, $p=0,415$].

Posteriormente, se realizó un ANOVA MMRR, para ver si existían diferencias entre los Grupos a lo largo de los días, los resultados mostraron que no existían diferencias significativas a lo largo de las semanas [F(14, 91)=0,971, p=0,489] (FIGURA 66).

Sciatic Functional Index

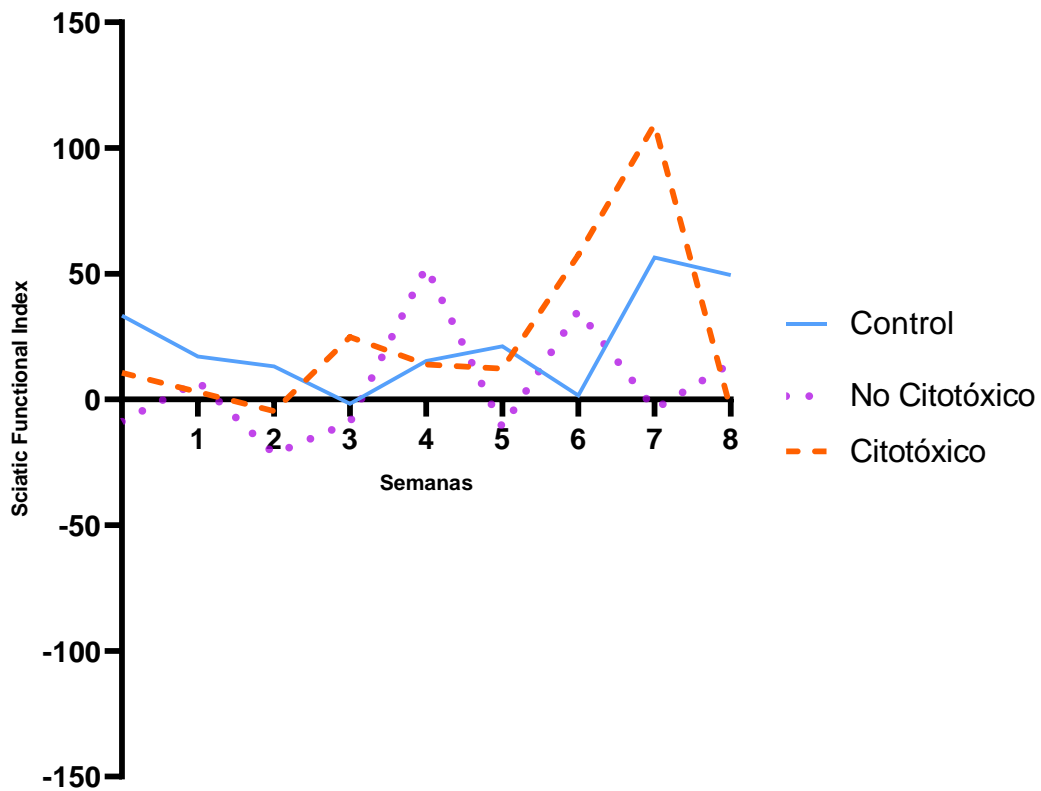


Figura 66: Resultados del análisis de las huellas. Se muestran los resultados del Sciatic Functional Index.

DISCUSIÓN

En este proyecto se ha inoculado de forma aguda y crónica LCR de pacientes de ELA y de controles a ratas Wistar, planteándose que podría ser un modelo de difusión de la ELA y que permitiría estudiar la patología esporádica.

Como se ha visto en apartados anteriores, la mayoría de los modelos que se utilizan para el estudio de esta patología, están basados en mutaciones asociadas a la patología familiar. Además, estos modelos no representan la totalidad de la patología encontrada en humanos. Es por ello que este proyecto se planteó como una solución a la escasez de modelos animales, que analizara la patología esporádica. Los resultados demostraron que esta forma de generar la patología recapitula la mayoría de los hallazgos encontrados en los pacientes de ELA.

Infusión de LCR como modelo esporádico de ELA

La capacidad del LCR de algunos pacientes de ELA de ser citotóxico para las motoneuronas en cultivos, ha sido descrita en repetidas ocasiones (264, 266, 267, 271, 272, 286-295), así mismo también es citotóxico para otros tipos celulares como pueden ser la microglía o los astrocitos (296-298) y es un hecho que se ha demostrado de igual forma en este trabajo, cuando durante el proceso de caracterización de los LCR a utilizar, se observó cómo algunos líquidos testados provocaban una muerte de motoneuronas.

Es interesante destacar que a pesar de que el LCR de pacientes de ELA es citotóxico para las motoneuronas en cultivos, se ha demostrado que no altera las características clínicas en los pacientes, es decir, no presenta influencia en la sintomatología, el inicio de la enfermedad, la severidad o la supervivencia (269). Esto correlaciona con los resultados de este estudio, ya que clínicamente, los animales no muestran diferencias en la clínica tal y como indican los resultados de las pruebas de comportamiento, así como la evolución del peso corporal.

Teniendo en cuenta la capacidad citotóxica del LCR, así como su posible implicación como transmisor de la patología (265), nuestro grupo se planteó, en un estudio previo al que aquí se describe, la posibilidad de que la infusión continua ICV de LCR citotóxico de pacientes, podría alterar histopatológica y funcionalmente el SNC. En dicho estudio se demostró que a pesar de que funcionalmente no se encontraban cambios similares a la ELA, histopatológicamente los animales expuestos al LCR citotóxico desarrollaban cambios similares a los encontrados en los pacientes de ELA. Entre estos cambios se encuentran una activación microglial y astrogliar, así como la sobreexpresión de proteínas como la S100 β en los astrocitos. Además, se encontraron inclusiones citoplasmáticas en las motoneuronas en conjunto, con un aumento del marcaje de caspasa 3 (274).

Tras estos resultados se planteó el estudio objeto de esta Tesis, en la que analizamos si la infusión continua tanto aguda como crónica, podría también desarrollar cambios electrofisiológicos e histológicos similares a los encontrados en los pacientes. Los resultados de este estudio demostraron una alteración histopatológica y a diferencia del estudio anterior se encontraron alteraciones electrofisiológicas, sin embargo, no se veían alteradas las características clínicas de los animales. En los siguientes apartados se profundizará sobre cada uno de los resultados obtenidos.

Las alteraciones *in vivo* provocadas por la administración de LCR de pacientes de ELA en modelos animales ha sido descrita por diversos autores. En un estudio reciente, utilizando la administración ICV continua de LCR en ratones transgénicos para *TDP43*, se demuestra que el LCR de pacientes de ELA presenta factores que podrían estar involucrados en la difusión de la patología (275).

Otros estudios que utilizan inyecciones puntuales de LCR en modelos animales, demuestran que este tipo de aproximación también desarrolla características similares a las encontradas en la infusión continua. Los resultados de estas investigaciones muestran degeneración de motoneuronas (290, 299, 300), alteraciones en la regulación de diferentes factores tróficos (301), alteraciones en el retículo endoplasmático de las neuronas motoras, además de fragmentación del aparato de Golgi, alteración en los canales iónicos de este tipo celular, fosforilación de los neurofilamentos e inclusiones citoplasmáticas (271, 272, 289, 302, 303). Las alteraciones no solo ocurren en las motoneuronas, sino que también ocurren en otros tipos celulares como los astrocitos (294, 298). Así mismo, existen alteraciones en la miogénesis en músculos como el gastrocnemio (304), además de alteraciones en las uniones neuromusculares y denervación (273), disfunción en la mitocondria, así como aumento de las ROS y desregulación de la vía lisosomal (293), posiblemente estos resultados sean producto de los tiempos cortos de análisis ya que existe una ventana muy próxima entre la inyección de LCR y el sacrificio del animal, por lo que un posible sustrato inflamatorio agudo jugaría un papel en los resultados obtenidos.

Hoy en día solo existe otro modelo que intente recapitular la patología esporádica, el Modelo Químico L-BMAA, sin embargo todavía no existe ningún modelo basado en esta sustancia que recapitule de forma exitosa los síntomas clínicos y de comportamiento, así como la neuropatología correspondiente a los pacientes de esta enfermedad (305).

Todos los resultados descritos confirman que la infusión, tanto puntual como continua de LCR citotóxico de pacientes de ELA es una buena aproximación para generar un modelo de ELA-E, ya que recapitula la mayoría de los hallazgos observados en los pacientes de esta patología. Esto sería de gran interés para la comunidad científica debido a que en la actualidad no existe ningún modelo basado en la patología esporádica, sino que todos están basados en las mutaciones asociadas a la patología familiar (306).

Neuroinflamación

El hallazgo más interesante del presente estudio fue un aumento de la neuroinflamación tanto en el Modelo Agudo como en el Crónico, y tanto en la corteza motora como en la médula espinal, con una activación de la microglía IBA1+, células MHCII+ y GFAP. Tras conocer los resultados de IBA1 del Modelo Agudo, se planteó estudiar en el Modelo Crónico la activación de este tipo celular, así como cuál era el estadio de las células IBA1+ activadas, es por ello que se estudió la polarización M1, M2. El Grupo ELA-Citotóxico mostraba una marcada inclinación hacia el estadio proinflamatorio, observándose un aumento del marcaje de células CD86+, mientras que, por su parte, el Grupo ELA-No Citotóxico mostraba que la microglía se encontraba en un estadio activado antiinflamatorio, aumentando el marcaje de ARG1.

Microglía

Como se ha comentado ampliamente en este trabajo, las células de microglía son los macrófagos del cerebro y de la médula espinal, participan en el desarrollo del SNC y juegan un papel importante en la homeostasis del cerebro, sin embargo, bajo condiciones neurodegenerativas, estas células se desregulan y se convierten en destructivas para el SNC (307, 308).

Los resultados obtenidos en este trabajo, correlacionan con lo encontrado en estudios realizados con tejidos *post mortem* (309). Diversos estudios de transcriptómica demuestran que existe una sobrerregulación de los genes que participan en la neuroinflamación (48, 310). Estudios de ARNseq realizados en muestras de pacientes de ELA-E han demostrado también que la población microglial sufre una sobreexpresión en estos pacientes cuando se compara frente a Controles (311).

En los tejidos de los pacientes de ELA, se produce un aumento del marcaje de microglía, caracterizado por el marcador IBA1 a lo largo del tracto corticoespinal (310). Otros estudios también demuestran un aumento del marcador IBA1, aunque sin llegar a ser significativo en la corteza motora de pacientes, que además correlaciona con un aumento de los niveles de MHCII, al igual que sucedía en nuestros resultados (312, 313). Se ha demostrado que la expresión de MHCII en el SNC de pacientes de ELA se concentra en los fagocitos perivasculares y en la microglía (313). A pesar de no llegar a niveles significativos, sí que se observa un cambio morfológico en este tipo celular, transformándose a un estado activado en los tejidos de los pacientes (314).

Los estudios de neuroimagen realizados a pacientes sintomáticos han demostrado también esta activación microglial (315-317), la cual sucede en regiones donde se ha producido una pérdida significativa de motoneuronas (56).

Todo esto presenta relación con la clínica de los pacientes, donde se observa que un aumento de la patología microglial correlaciona con la progresión de la patología, relacionándose con los déficits provocados por el deterioro de las motoneuronas superiores (318). Uno de los aspectos más interesantes es que la activación microglial ocurre de forma previa, o a la vez que el inicio de los síntomas clínicos, y que se ve incrementada con el curso de la enfermedad (319). Recientemente se ha visto que ciertos fármacos como el Masitinib, un inhibidor de la tirosina kinasa, produce una disminución de los niveles de microgliosis y esto mostraba efectos beneficiosos para los pacientes de ELA (48, 320).

Al igual que sucede con los datos procedentes de pacientes, nuestros resultados relativos a la microglía también correlacionaban con lo encontrado en estudios realizados en modelos animales de ELA.

Estudios realizados mediante PET mostraron un aumento en la captación del [¹¹C]PBR28, en ratones SOD1-G93A. Este radio trazador es un biomarcador para inflamación y activación microglial. La mayor captación se produjo en pulmones, parte posterior del cerebro, tronco del encéfalo y en la médula espinal (321).

Numerosos estudios demuestran el incremento de la microgliosis en los animales SOD1 mutantes, así como el diferente fenotipo que presentan estas células al activarse (211, 322-327). De hecho, uno de los mayores hallazgos realizados en este modelo animal es que en ésta patología, no solo se veían afectadas las motoneuronas, sino que otros tipos celulares como la microglía también se alteraban (328).

En estos animales transgénicos, la microgliosis sucede o, de forma previa, o de forma simultánea al inicio de los cambios degenerativos, y este proceso aumenta de forma significativa con el tiempo, y además se producen en las regiones donde se produce la mayor degeneración neuronal (329). Este proceso sucede en todos los animales transgénicos para este gen, incluso en los que sobreexpresan un número bajo de copias del gen mutado (325).

En este estudio, los resultados obtenidos en el análisis de la activación de la microglía demuestran un aumento, tanto de los marcadores correspondientes al estadio proinflamatorio como al antiinflamatorio, sin embargo, el Grupo ELA-No Citotóxico presenta una mayor activación del estadio antiinflamatorio, determinado por el marcador Arg1, que el Grupo ELA-Citotóxico, el cual presenta mayores niveles de marcaje CD86, característico del estadio proinflamatorio. En animales SOD1 se ha visto a lo largo de toda la patología, un aumento del marcaje de Arg1 y de iNOS (marcador proinflamatorio) (Óxido nítrico sintasa) en la médula espinal (330), por lo que los resultados del modelo que aquí se presenta correlacionan con los obtenidos en otros modelos de ELA.

En ratas SOD1-G93A, se ha observado que, durante la fase presintomática, a pesar de que hay microgliosis, esta microglía está en estado quiescente. Posteriormente cuando estos animales entran en un estado sintomático las células de microglía pasan a un estado activado (331). Esto podría tener relación con el hecho de que animales quiméricos que expresaban la SOD mutante en las motoneuronas y la SOD *wild-type* en las células gliales se mantenían sanos, sin embargo, cuando estas células gliales también presentaban la enzima mutante, estos animales comenzaban a presentar degeneración. Este hecho parece indicar la estrecha relación que existe entre las células gliales y las motoneuronas en el curso de esta patología (332).

Así mismo, al igual que sucede con la microglía, se ha demostrado que los ratones SOD1-G93A presentan un aumento significativo de las células MHCII+, previo al inicio de la parálisis y que aumenta durante la fase parálítica de estos animales (333). Esto correlaciona con lo encontrado en los resultados de este estudio, en el que los animales, sin presentar sintomatología, histológicamente presentaban un aumento de MHCII.

La afectación microglial no solo se ha encontrado en modelos SOD, sino que también ocurre en otros tipos de modelos como, por ejemplo, el modelo C9orf72. En animales donde se produce una pérdida de C9orf72, aumentan las respuestas proinflamatorias ya que se altera su función a niveles transcriptómicos (334, 335). Sin embargo, en este caso, dependiendo de los DPR que se expresen, se produce o no, la activación de esta microglía. Por ejemplo, los ratones que expresan poli-GA muestran una microglía ameboide, mientras que los poli-PR, asintomáticos o no, muestran una microglía ramificada (211).

Por su parte, en el modelo TDP43 se ha visto también un aumento de la activación microglial. Por ejemplo, animales portadores de la mutación A315T mostraban un aumento de la activación, que comenzaba a distintos tiempos según la zona de la corteza motora se encontrasen estas células, mientras que las células de la capa 5 se activaban a día 60 y las de la capa 2/3 lo hacían a día 90, esto es indicativo de un incremento de la activación con el curso de la patología (211).

En los animales Wobbler, a los pocos días del nacimiento, también se ha encontrado microgliosis junto con la activación de este tipo celular en la corteza motora, en el cerebelo y en la materia blanca. La neuroinflamación de estos animales, tanto la microgliosis como su activación, es capaz de reducirse si se trata a estos animales con glucocorticoides (211).

Los modelos transgénicos antes descritos muestran un sustrato importante relacionado con la inflamación, además la evolución de la patología es muy acelerada, menos de tres meses, con un empeoramiento repentino de los síntomas y la muerte de los animales en menos de 30 días, por lo que, son un conjunto de modelos que nos permiten evaluar fenómenos relativos a los mecanismos implicados en la ELA, pero no son comparables con el humano por las diferencias cronológicas y del metabolismo que existen entre el hombre y el roedor.

Astrocitos

En el presente trabajo tanto en el Modelo Agudo como en el Crónico, encontramos una marcada astrogliosis en el Grupo ELA-Citotóxico. Por su parte en el Modelo Crónico, el Grupo ELA-No Citotóxico también presenta astrogliosis con respecto al Grupo Control, pero en menor medida que el Grupo ELA-Citotóxico.

Los astrocitos son las células gliales más abundantes del SNC. En el SNC sano ejercen numerosas funciones tales como la formación, maduración y eliminación de sinapsis, modulando a su vez la actividad sináptica y la plasticidad, así mismo, participan en la homeostasis iónica, aclaramiento de neurotransmisores o regulan el volumen del espacio extracelular (64, 68). Al mismo tiempo los astrocitos participan en la respuesta inflamatoria, en la considerada astrogliosis reactiva donde juegan un papel crucial en la progresión de las enfermedades neurodegenerativas. Inicialmente la astrogliosis reactiva se caracteriza por una hipertrofia de los somas y las ramificaciones (336).

La astrocitosis será más o menos severa según el nivel de daño que esté presente. La principal diferencia entre la astrocitosis moderada y la severa es que, a pesar de que en ambos existe una sobreexpresión de GFAP y de factores proinflamatorios, en la astrocitosis severa también existe una proliferación celular, donde las ramificaciones de estos nuevos astrocitos solapan a las ramificaciones de los otros astrocitos (73, 337).

Al igual que sucede con los resultados obtenidos en el presente estudio, se ha observado que pacientes de ELA presentan un aumento de los astrocitos reactivos en las regiones más vulnerables, y así mismo, se ha relacionado el grado de reactividad astrogliar con el grado de neurodegeneración (336). Esto se evidencia en que la gliosis en las astas motoras de la médula espinal de los pacientes es un hallazgo común en todos ellos, correlacionando inversamente con el número de motoneuronas sanas (338, 339).

Por su parte en la corteza motora de los pacientes, se ha determinado un aumento de la reactividad astrocitaria en las capas 2 y 3, así como en la capa piramidal, aunque también se ha encontrado esta reactividad astrogliar en otras regiones del cerebro (338). Los astrocitos de la capa piramidal suelen formar *clusters* y algunos de estos astrocitos extienden sus ramificaciones hacia los vasos sanguíneos o están en íntimo contacto con la microglía (340).

El N-acetilaspártato (NAA) y el myo-inositol (mIns) son marcadores espectroscópicos que correlacionan con la neurodegeneración, marcando la integridad neuronal y la astrogliosis respectivamente. En estudios de imagen realizados a pacientes de ELA, se ha observado que la ratio NAA:mIns se encuentra reducida, lo que correlaciona con un aumento de la astrogliosis, además de ser un buen predictor de la supervivencia de estos pacientes (341-346). En estudios realizados con PET se ha observado un aumento de la captación del radiotrazador ^{18}F -THK5351, este trazador cuantifica la actividad de la mono amino oxidasa B, que se ve aumentada en lesiones donde se está produciendo una astrogliosis (347). Así mismo también se ha observado un aumento de la captación de [^{11}C]-PBR28 que se une a la proteína translocadora, la cual se eleva en los astrocitos reactivos (348).

Nuestros resultados relativos a los astrocitos también correlacionan con lo obtenido previamente en modelos animales de ELA.

El modelo SOD1 ha contribuido al entendimiento de los mecanismos que subyacen a esta patología, entre ellos, el papel que juegan los astrocitos en esta enfermedad (223, 349). Diversos estudios en estos animales han demostrado que la gliosis comienza antes del inicio de la sintomatología y va aumentando con el progreso de la enfermedad (220, 224, 350).

Este aumento de la reactividad astrogliosa sucede en animales SOD1, independientemente de su *background* genético, es decir, todos los animales portadores de mutaciones en *SOD1* presentaban esta astrogliosis. Como ejemplo de ello tenemos los ratones SOD1-G37R generados por El Oussini y colaboradores, donde se ha observado una marcada astrogliosis en las astas motoras de la médula espinal de estos animales, así como en otros animales portadores de esta mutación (235, 236). En ratones SOD1-G93A también se ha demostrado que estos animales presentan astrogliosis marcada en la corteza motora, la médula espinal y los núcleos motores del trigémino (232, 351). Otras mutaciones como G85R muestran alteraciones en los astrocitos de forma previa a las alteraciones observadas en las motoneuronas (352).

En un estudio con ratas Wistar, a las que se les infundió un medio condicionado procedente de cultivos primarios de astrocitos, que expresaban la mutación SOD-G93A, se demostró que estos animales presentaban una marcada astrogliosis en las regiones motoras de la médula espinal (353).

La marcada reactividad astrogliosa no solo se evidencia en los animales SOD1, sino que en animales portadores de otras mutaciones asociadas con esta patología también muestran una marcada astrogliosis. Por ejemplo, animales que expresan la mutación A315T, muestran un aumento de células positivas para GFAP en todas las capas de la corteza motora a edades tempranas al igual que en la médula espinal, incrementándose con el paso del tiempo (247, 354). Así mismo se encuentra astrogliosis elevada en el hipocampo de ratones transgénicos para *TDP43* (355, 356). En ratones portadores de la mutación M337V, se ha demostrado que existe reactividad astrogliosa en el tronco del encéfalo y en la médula espinal (357). Incluso en ratones portadores de la *TDP43* humana, se encuentra un aumento de GFAP en la médula espinal en espacios cortos de tiempo (358). Por su parte, en ratas transgénicas para *TDP43* también se encuentra un aumento de la astrogliosis en la médula espinal, corteza motora e hipocampo (359, 360).

El modelo Wobbler también muestra astrogliosis reactiva en la médula espinal y en el tronco del encéfalo, durante la fase evolutiva de la patología. Esta astrogliosis reactiva está determinada por un aumento de células GFAP positivas, así como por una hipertrofia en su morfología, mostrando somas alargadas y ramificaciones más finas (207, 213, 214, 361, 362).

Los modelos FUS, igualmente, muestran un aumento de la astrogliosis en el cerebro y en la médula espinal. Un ejemplo de ello son las ratas que expresan la FUS humana mutante, en las que se encuentra una proliferación de astrocitos en el giro dentado del hipocampo y en la médula espinal lumbar (249). En ratones que sobreexpresan la FUS humana, así como en aquellos con la mutación R521C, muestran astrogliosis en la médula espinal (363, 364).

En animales C9ORF72 que expresan dipéptidos de repetición, como el poli-PR, se ha encontrado que existe gliosis, tanto en la médula espinal lumbar como en el cerebelo, en espacios cortos de tiempo y se ve incrementada con la evolución de la patología (156). Modelos creados mediante la tecnología BAC, demuestran que existe astrocitosis en la materia blanca del hipocampo, así como en el giro dentado. Además, también se encuentra aumento del marcaje de GFAP en las capas 1, 2, 3 y 5 de la corteza motora (258).

La astrogliosis también es evidente en los modelos inducidos por L-BMAA, independientemente de que la forma de administración sea intratecal o intravenosa. Dicha astrogliosis se observa tanto en la médula espinal como en la corteza motora y se ve incrementada con el progreso de la patología (365, 366). Este hallazgo se ha observado en diferentes especies, como las ratas y los monos *Vervet* (365-367). Sin embargo, cuando este compuesto se administra a través de la dieta, no se observan cambios en los astrocitos (368). Un hecho interesante es que cuando esta sustancia se administra a dosis sub-tóxicas en animales SOD1-G93A, se reduce la proliferación de astrocitos (369).

Un aspecto realmente interesante en el proceso neuroinflamatorio, es que la reactividad microglial sucede de forma previa a la astrogliosis (370), este hecho se ha demostrado en trabajos previos de nuestro Grupo de Investigación, en el que se utilizó el mismo método para inducir la patología que el utilizado en el presente trabajo. En ese estudio se demostró que la activación microglial ya era evidente 45 días tras la implantación de las mini bombas osmóticas, sin embargo, la reactividad astrocitaria también empezaba a presentarse en ese mismo periodo de tiempo (274, 371). Este proceso evidencia que la microglía libera ciertos factores como son la IL-1 α , TNF α y C1q que inducen la reactividad astrogliosis (372, 373).

Algunos estudios, en modelos animales de ELA, han intentado contrarrestar los efectos tóxicos de la neuroinflamación producida por el aumento de la activación microglial en estado proinflamatorio, sin embargo, no han encontrado efectos beneficiosos en cuanto a la progresión de la patología, a pesar de que sí se reducen los niveles de citoquinas proinflamatorias. Esto podría ser debido a la relación tan estrecha que existe en el espectro M1-M2 de las células de microglía, ya que a pesar de que se inhiben ciertas vías proinflamatorias, también se suprime la expresión de genes relacionados con M2, lo que contrarrestaría el efecto (374).

Otros estudios han administrado tratamientos inmunosupresores al inicio de la patología a modelos animales transgénicos para ELA, en ellos observaron que, tras la administración del tratamiento, se aumentaba la supervivencia de estos animales, sin embargo, al trasladar esto a los humanos tampoco se han encontrado efectos beneficiosos (375).

Una de las principales funciones de los astrocitos es mantener unos bajos niveles de glutamato extraneuronal. Este proceso se realiza mediante el aclaramiento de este neurotransmisor del espacio sináptico, a través de los transportadores de glutamato EEAT2. En los pacientes de ELA-F y de ELA-E, se ha observado, tanto en el cerebro como en la médula espinal, que existe una reducción de los niveles de ese transportador. Esta pérdida de EEAT2 está íntimamente relacionada con la degeneración motoneuronal en los pacientes (79), debido a que se produce un aumento de la excitotoxicidad, elevándose los niveles de ROS, agravando el daño que ya de por sí muestran las motoneuronas (64, 376).

Algo importante a destacar, teniendo en cuenta la neuroinflamación, es que la mayoría de las investigaciones en modelos animales, se realizan en estadios presintomáticos o en los inicios de la de la patología. Este es un hecho que podría explicar los fallos que existen en la traslación desde los estudios preclínicos a los estudios clínicos, ya que no es posible tratar a los pacientes en estadios presintomáticos o en el inicio de la sintomatología (211).

Neurodegeneración

Los resultados histológicos obtenidos en este estudio demuestran en el Modelo Agudo, una reducción significativa en el marcaje de ChAT en el Grupo ELA, tanto en la corteza motora como en la médula espinal. Este hecho es indicativo de una reducción en el número de motoneuronas. Así mismo, también se observó una disminución en el marcaje de NeuN, indicativo de que la neurodegeneración no sucede exclusivamente en las motoneuronas, sino que todos los tipos neuronales se ven afectados. En el Modelo Crónico por su parte, también se observa una reducción en los niveles de ChAT, tanto en la corteza motora como en la médula espinal en el Grupo ELA-Citotóxico. Sin embargo, en el Grupo ELA-No Citotóxico encontramos un aumento del marcaje en la corteza y una reducción en la médula, posiblemente como un mecanismo de compensación y plasticidad modulando alteraciones sinápticas, buscando compensar desde el territorio de la motoneurona cortical, los posibles déficits en la segunda motoneurona medular.

La degeneración neuronal es la principal característica neuropatológica observada en la ELA tanto en los pacientes, como en modelos animales (377), es por ello que el modelo que aquí se presenta recapitula de forma consistente la principal característica de la patología.

Los resultados obtenidos en diversos estudios realizados en tejidos *post mortem* demuestran, al igual que los resultados de este estudio, que existe una pérdida de motoneuronas tanto en el cerebro como en la médula espinal de los pacientes (378), a pesar de que en diversos estudios se ha observado que la degeneración neuronal estaba restringida a la médula espinal, tanto en casos de ELA-F, como de ELA-E (379-381). Sin embargo, otros estudios sí que encuentran degeneración neuronal en el cerebro (382-384).

Este hecho se evidencia no solo en tejidos *post mortem*, sino que también en estudios de imagen realizados en estadios sintomáticos se refleja esta degeneración, principalmente se observa un descenso en la captación de NAA en las regiones cerebrales (342-346).

Un hallazgo interesante es que a pesar de la pérdida neuronal que ocurre en los pacientes, estos presentan un aumento de la proliferación de progenitores neurales en la zona subventricular (268).

Los resultados obtenidos en este estudio también correlacionan con los obtenidos en trabajos previos en modelos animales.

El estudio con el modelo SOD1, ha determinado que estos animales sufren un proceso neurodegenerativo, en el cual se produce principalmente una pérdida de las motoneuronas (221, 224, 226-229, 232, 322, 350, 385, 386). Esta degeneración de las motoneuronas es evidente incluso en los estadios presintomáticos de estos animales (387), lo que correlaciona con los resultados de éste estudio, ya que no se observan cambios en el comportamiento pero sí se observan alteraciones histológicas. Es importante destacar que la mayoría de estos animales muestran la degeneración en la médula espinal, sin embargo, la degeneración en la corteza motora no es tan evidente, a pesar de que es una característica que sí sucede en los pacientes (226). Este hecho no sucede en el modelo que aquí se expone, ya que se presenta degeneración evidente de las motoneuronas, tanto en la médula espinal como en la corteza motora.

Algunos estudios realizados con animales transgénicos para *c9orf72* demostraban que estos animales desarrollan neurodegeneración generalizada en el cerebro y la médula espinal, siendo la región hipocampal y la corteza, las más afectadas (156, 258, 259, 388-395). Sin embargo, otros estudios no evidencian dicha degeneración (255, 256, 396, 397). La pérdida de las neuronas motoras en la médula espinal de estos animales puede llegar a ser de hasta del 47% (391).

Los modelos TDP43 generados hasta el momento, presentan diferencias en cuanto al diseño y a la especie donde se generan, sin embargo, todos ellos tienen en común ciertas características como la degeneración de los axones, así como la pérdida neuronal, que principalmente afecta al sistema motor (241, 243, 245, 247, 354, 356, 357, 360, 398-402).

En los modelos FUS, sucede algo similar a los de C9ORF72, algunos estudios no encuentran degeneración de las motoneuronas de estos animales (251, 252). A pesar de ello, algunos investigadores sí han encontrado alteraciones de las motoneuronas en estos modelos (248, 249, 253, 403-405).

Por último y a pesar de que los modelos basados en L-BMAA no recapitulan en su totalidad la patología de ELA-E, diferentes investigaciones han demostrado que estos animales presentan una pérdida neuronal severa (365, 406), en regiones como el hipocampo, el estriado, la sustancia *nigra* y las astas ventrales de la médula espinal (366, 407). Además de producirse pérdida neuronal, también se observan alteraciones en las mismas (238, 408, 409). Estudios de neuroimagen realizados en estos animales muestran una reducción del volumen de la corteza, aumento del volumen de los ventrículos laterales, así como aumento de las alteraciones de los núcleos bulbares (238). A pesar de estos estudios, otros investigadores no han encontrado alteraciones neuropatológicas a raíz de la ingesta de esta sustancia (368).

Los resultados obtenidos en el Grupo ELA-No Citotóxico muestran un ligero incremento anecdótico, pero en el grupo ELA Citotóxico el incremento fue significativo, y las inclusiones observadas compartían marcaje en gran medida con ubiquitina, estrechamente relacionado en el sistema lisosomal/proteasoma responsable del desdoblamiento de proteínas mal plegadas, como es en el caso de la TDP43 encontrada en el citoplasma, y características de la patología humana (107).

Electrofisiología

La función motora de los pacientes de ELA va declinando durante el desarrollo de la patología, es por ello que evaluar esta función motora tanto en los pacientes (410), como en los modelos animales, es de vital importancia para ver si estos últimos recapitulan los hallazgos obtenidos en pacientes. Una de las técnicas que permite evaluar la función motora, es la electrofisiología.

Las enfermedades de motoneurona se clasifican a través de la patogénesis y la localización de la degeneración en las motoneuronas superiores, inferiores o ambas. La ELA es la enfermedad de motoneurona más común y en ella se afectan ambos tipos de motoneuronas. La degeneración de las motoneuronas superiores se caracteriza por hiperreflexia, signo de Hoffmann, presencia del reflejo de Babinski, debilidad piramidal y espasticidad, entre otras. Por su parte la degeneración de las motoneuronas inferiores está caracterizada por fasciculaciones, debilidad muscular, calambres musculares, hipo o arreflexia e hipotonía y atrofia (13, 182, 411).

Los estudios neurofisiológicos realizados, de rutina en ELA, incluyen estudios de la conducción nerviosa, EMG y de forma menos común, la estimulación magnética transcraneal (EMT). Durante los primeros estadios de la patología la conducción de los nervios motores es normal, sin embargo, conforme avanza la enfermedad la amplitud del potencial de acción muscular se ve reducida, indicativo de denervación. Por su parte la conducción nerviosa sensorial se mantiene normal en estos pacientes. Los principales hallazgos encontrados en el EMG de los pacientes de ELA son los potenciales fibrilatorios, ondas agudas positivas, así como cambios neurogénicos (183). Sin embargo, estas técnicas, son poco aplicables en los modelos animales debido a sus características metodológicas. Por su parte, el electromiograma y el estudio del reflejo H son técnicas sencillas de reproducirse tanto en humanos como en animales, sumado a esto, el reflejo H se utilizó en este estudio como indicador de la excitabilidad neuronal espinal en relación con el desarrollo de la patología, dado que era una herramienta accesible en nuestro laboratorio (ya que no disponemos de otras técnicas como EMT) y estos mismos datos permitían medir conducción nerviosa, por lo que se consideró adecuado.

En este estudio se ha utilizado la electromiografía para analizar la evolución del reflejo H en las extremidades traseras de los animales objeto de estudio. Este reflejo se evaluó mediante los cambios producidos en la onda M y en la onda H durante los protocolos de intensidades y frecuencias, realizados semanalmente durante toda la duración del estudio.

En sujetos sanos el reflejo H presenta las siguientes características (412):

- Se puede evocar por una estimulación eléctrica subumbral del nervio que inerva el músculo, debido a que las fibras nerviosas aferentes presentan un umbral más bajo que las fibras motoras.
- Conforme se aumenta la intensidad de estimulación, las fibras motoras se activan en mayor número, viajando en sentido antidrómico, hacia el soma espinal. Esto provoca un periodo refractario axonal que impide pasar al potencial de acción ortodrómico (desde el soma espinal hacia la terminal en la sinapsis muscular) y por tanto reduciendo la respuesta refleja conocida como onda H.
- La latencia disminuye conforme el sitio de estimulación se desplaza de forma proximal.
- El potencial puede facilitarse mediante las contracciones activas del músculo, por estiramiento pasivos del músculo, y tras la estimulación tetánica.
- Se puede inhibir por la contracción activa de los antagonistas y por el acortamiento pasivo del músculo.

La Mmax se corresponde con la señal electromiográfica de mayor amplitud que se obtiene por la contracción del mayor número de fibras musculares en respuesta al estímulo eléctrico que activa de forma directa el máximo de axones de motoneuronas espinales. Al mismo tiempo, la Hmax se corresponde con la señal electromiográfica de mayor amplitud producida por la contracción muscular en respuesta del número máximo de motoneuronas que se activan en la conexión monosináptica espinal de la fibra sensorial sobre la motoneurona espinal. Por tanto, cuando se utiliza la ratio Hmax/Mmax se obtiene una media del porcentaje de motoneuronas del *pool* que pueden ser activadas de forma óptima por la vía del reflejo H (187). En animales sanos, se encontró que la ratio Hmax/Mmax fue del 20% aproximadamente (413), lo que correlaciona con los datos obtenidos en nuestros grupos control.

Cuando la ratio Hmax/Mmax se ve alterada en el reflejo de Hoffmann con respecto a una población control, se considera un signo de alteración de la excitabilidad de las motoneuronas espinales. Si la alteración es una bajada de la ratio Hmax/Mmax se deberá a una reducción del pool de motoneuronas reclutadas a nivel espinal, ya que la onda M no puede incrementar. Mientras que una subida de la ratio Hmax/Mmax, podría deberse bien a un aumento de la onda Hmax, lo que sucede cuando falta control de la motoneurona superior (o cualquier otro control supraespinal como el control bulbar). Lo que indicaría un inicio cortical o bulbar de la ELA. O bien el aumento de la ratio podría deberse a una disminución de la onda Mmax que afectaría a motoneuronas que no participan de la Hmax, en este caso el diagnóstico indicaría un inicio espinal de la ELA. Aunque, solo existen unos pocos estudios que analicen este reflejo en los pacientes, debido a que prevalecen otras técnicas se ha demostrado que este reflejo es una buena medida de la excitabilidad del *pool* de motoneuronas (195).

La mayoría de los estudios electrofisiológicos existentes son realmente útiles para evaluar el daño de las motoneuronas inferiores, sin embargo, no existen apenas herramientas para la evaluación del daño en las motoneuronas superiores. Una de ellas es el reflejo H (188, 195, 414), cuando se corresponde con un incremento de la ratio H_{max}/M_{max} sin que haya disminuido M_{max} . Recientemente, se ha utilizado el reflejo de Hoffmann para evaluar el deterioro del tracto corticonuclear. Este reflejo se ha visto que es mucho más predominante en los pacientes de ELA que en los sujetos sanos (195). Otras investigaciones también han evaluado la alteración electrofisiológica de las motoneuronas superiores y lo han correlacionado con la supervivencia de los pacientes, encontrando que las alteraciones electrofisiológicas del músculo geniogloso correlacionan con una supervivencia menor, un inicio precoz de la disfagia y una severa disartria (415). En otros estudios retrospectivos y prospectivos también se ha correlacionado el grado de denervación, analizado mediante EMG, con el peor pronóstico de la enfermedad y la menor supervivencia (416-419), así como con la escala funcional ALSFRS-R (420).

En humanos, los resultados en cuanto a la excitabilidad intrínseca son contradictorios, debido a que se ha encontrado tanto hiperexcitabilidad como hipoexcitabilidad dependiendo de la mutación, la edad y el enfoque experimental. Esto impide saber si estos cambios serían compensatorios o patológicos (421).

Las motoneuronas inferiores están moduladas por las superiores, mediante las proyecciones descendentes de la vía corticoespinal desde la corteza motora. La influencia que reciben estas motoneuronas desde las superiores es deletérea para la supervivencia de estas. La excitabilidad de las motoneuronas inferiores correlaciona con su supervivencia, y la poca hiperexcitabilidad que presentan, puede reflejar un mecanismo compensatorio de las que sobreviven. El que las motoneuronas superiores degeneren de forma previa a las inferiores correlacionaría con la posibilidad de la teoría *dying-forward* (422, 423).

Se ha observado un aumento de la excitabilidad en el *pool* de motoneuronas en aquellos pacientes de ELA que presentan un curso clínico más lento. Además se encuentra, que conforme avanza la patología se produce un descenso en las amplitudes de la onda M (194), ya que la disfunción axonal o la muerte de la motoneurona espinal conlleva un menor reclutamiento de fibras musculares, por tanto mejor onda M. Una de las características de los pacientes de ELA es la presencia de espasticidad, producida principalmente por la hiperexcitabilidad en las motoneuronas inferiores (422). El reflejo H, de forma general, aumenta cuando existe espasticidad, mientras que la onda M no se suele ver afectada. Es por ello que la ratio H/M suele ser mayor en las extremidades afectadas por la espasticidad (192, 193, 424). En los pacientes que presentan un inicio bulbar de la patología, los cambios electromiográficos siguen un gradiente descendente rostrocaudal lo que implica que la región lumbosacra es la menos afectada de estos pacientes (425).

La hiperexcitabilidad sostenida de las motoneuronas corticales, inducida mediante despolarización, podría estar apoyada por el aumento de la expresión de canales de sodio y, una bajada de la conductancia del potasio en los segmentos iniciales de los axones, donde se inician los potenciales de acción. Así mismo, también se asocia con el aumento de la excitotoxicidad provocada por el aumento de glutamato, provocado por una mayor liberación presináptica, así como por una menor recaptación en el espacio sináptico. Esto activa de forma desregulada los receptores AMPA y NMDA. Sumado a todo esto, en los pacientes de ELA se ha encontrado una menor inhibición cortical que en los sujetos sanos (422).

En nuestros resultados observamos una hiperexcitabilidad de las motoneuronas del Grupo Citotóxico evidenciada en un aumento general de la amplitud, tanto de la onda M como de la onda H, en ambos modelos en comparación con el grupo Control. Esto correlaciona con lo observado en algunos estudios realizados en humanos donde observaban un aumento de la excitabilidad de la motoneurona (194).

Los resultados electrofisiológicos en el protocolo de intensidades, muestran que la amplitud de la onda M en el Grupo Control prácticamente no varía a lo largo de todo el estudio, sin embargo, en el Grupo ELA Citotóxico a pesar de que las amplitudes son más elevadas que en grupo Control, se observa un descenso de las amplitudes de la onda M en las intensidades más altas conforme evoluciona la patología, sin llegar a ser significativo, lo que correlaciona con la denervación observada también histológicamente, caracterizada por una pérdida de células ChAT+, además de correlacionar con la neuroinflamación. Además, se observa que la onda H en el Modelo Agudo presenta unas amplitudes mayores en el Grupo ELA que en el Grupo Control, pero en este caso no se observan tantas diferencias en cuanto a la evolución de estas amplitudes, lo que indica que se están afectando las motoneuronas y no las sinapsis, ya que la onda M se ve más afectada que la H. En el Modelo Crónico por su parte se observa que las amplitudes de la onda H del Grupo Citotóxico son menores y que a pesar de una hiperexcitabilidad inicial se produce un descenso de la onda más acusado en este grupo, característico de los animales ELA (426).

Por su parte, los resultados obtenidos en el estudio de frecuencias mostraban que las amplitudes de la onda M en el Grupo ELA Citotóxico eran mayores que en el Grupo Control mostrando hiperexcitabilidad a nivel de motoneurona espinal, algo que sucede en los primeros estadios de la enfermedad. A pesar de ello cuando, las frecuencias de estímulo son altas en el Grupo Control, apenas se observa diferencia en la amplitud de la onda, sin embargo, en el Grupo ELA la amplitud se ve reducida de forma evidente cuando las frecuencias son altas, indicando que las motoneuronas no son fisiológicamente estables, aunque inicialmente sean hiperexcitables. En el caso de la onda H el descenso de la amplitud por el incremento de frecuencias de estimulación es normal ya que se alcanza el límite fisiológico de la sinapsis espinal (427, 428). De forma interesante en el grupo ELA se observa mayor reducción por efecto del incremento de la frecuencia, indicando que existe deterioro o reducción de la eficacia sináptica entre la fibra sensorial y la motoneurona espinal. Esta diferencia también se ha observado en animales modelo de lesión medular, donde la reducción del reflejo H es mucho más acusado con respecto a los animales sanos (427).

Las alteraciones electrofisiológicas han sido estudiadas en los animales SOD, en los que se ha visto que declina la contracción muscular, así como que se produce una pérdida funcional de las unidades motoras (429). En los animales SOD que sobreexpresan un número bajo de copias de la proteína mutada, se encuentra una hipoexcitabilidad inicial (430). Sin embargo, otros estudios han demostrado que existe una hiperexcitabilidad inicial en la corteza motora de los animales SOD (422, 431-433). Estos animales, presentan una denervación bastante acusada en las uniones neuromusculares, debido a que aproximadamente solo el 2% de estas uniones presentan una inervación completa (369). En ratones SOD1 se ha demostrado que existe una disfunción de las motoneuronas espinales, que comienza en torno a las 8 semanas de edad, evidenciada en varios estudios electromiográficos, sin embargo, los déficits funcionales no debutan hasta la semana 12 (426). En estos animales, se muestra una reducción tanto de la onda M como de la onda H que se ve incrementado con el tiempo y siendo más evidente en la onda H (426). Estos resultados correlacionan con los obtenidos en el estudio aquí presentado, ya que se evidencian alteraciones electrofisiológicas que no correlacionan con déficits de comportamiento. En modelos TDP43 también se encuentra una hiperexcitabilidad de las motoneuronas de la corteza motora (434). En modelos químicos, se encuentran alteraciones patológicas en los análisis electrofisiológicos, evidenciados mediante unas amplitudes menores y unas latencias prolongadas de los potenciales motores evocados, así como por un aumento de las amplitudes y duración de los potenciales de las unidades motoras. Todo ello indicativo de la destrucción de la inervación muscular (365). Por último, estudios realizados en ratas Wistar, a las que les infundían puntualmente LCR-ELA, han demostrado un aumento de la excitabilidad cortical en conjunto, con una pérdida de neuronas en esta región (270, 435).

Comportamiento

Los resultados de este estudio demuestran alteraciones histológicas y electrofisiológicas en los animales tratados con LCR citotóxico. A pesar de ello, cuando se analizan los cambios clínicos mediante en peso corporal y los tests de Matsumoto, Plano Inclinado y el Análisis de la Pisada no se observan cambios significativos entre los animales Control y los Citotóxicos.

Todos los Grupos mostraron tendencia al aumento del peso corporal medio a lo largo del estudio, sin llegar a ser significativo. En otros modelos animales, como por ejemplo los basados en la neurotoxina L-BMAA no se observaron cambios en cuanto a su peso corporal (261). Por su parte, modelos como el Wobbler muestran durante la fase sintomática una pérdida de peso evidente, hecho que en la fase presintomática no era evidente (10, 215), aunque en algunos estudios estos animales presentan un aumento de peso (436). Los modelos SOD1 muestran pérdida de peso, siendo ésta más pronunciada en los machos que en las hembras y más evidente a partir de las 15 semanas (15, 370, 374, 437). Por su parte, también se encuentra pérdida de peso en los animales C9ORF72 (156, 255, 257, 389), así como en los modelos FUS y TDP43 (252, 357, 358, 360), aunque en algunos estudios con animales FUS no se encontraron diferencias en cuanto al peso corporal (248).

Numerosos estudios han demostrado que la neuropatología asociada a esta enfermedad ocurre de forma previa o concomitante a la aparición de la sintomatología (319). Este hecho correlaciona de forma muy clara con nuestros resultados, en los que observamos que tanto histológicamente como electrofisiológicamente se producen cambios en el Grupo ELA, mientras que, en los estudios de comportamiento, no observamos ninguna diferencia entre los grupos, indicativo de que la sintomatología todavía no ha debutado en estos animales.

Una de las características más comunes que presentan los pacientes de enfermedades neurodegenerativas es la alteración de la función motora, y la evolución en la pisada es un buen método para estudiar estas alteraciones (438). Existen numerosas pruebas para analizar la función motora en los modelos de las enfermedades de motoneurona. Entre ellos encontramos el Rota-Rod, la fuerza de agarre o Análisis de la Pisada. De todos ellos, el más utilizado es el Rota-Rod, sin embargo, el Análisis de la Pisada parece ser una prueba más eficiente para estudiar la función motora (439-441).

El modelo Wobbler muestra alteraciones motoras a partir de la tercera semana desde su nacimiento, evidenciado en pruebas como el Rota-Rod (207, 213, 214). Las diferentes investigaciones realizadas en los modelos SOD1 muestran alteraciones motoras en estos animales, sin embargo, estas alteraciones, a diferencia del modelo Wobbler no suceden en las primeras semanas, sino que se hacen evidentes en torno a las 15 semanas desde el nacimiento, de hecho, en los primeros 3-4 meses de edad presentan una función motora normal (370, 442, 443), aunque algunas investigaciones demuestran que se pueden observar alteraciones en la locomoción de estos animales en estadios presintomáticos (444, 445). En animales SOD1 se encuentran variaciones en diferentes pruebas que miden la función motora como pueden ser el *Hanging wire*, Rota-Rod, patrón de las pisadas, ejercicios en la cinta, fuerza de agarre o barra suspendida (370, 446-451).

Otros animales como los transgénicos para *TDP43*, muestran déficits motores en torno a los 3 meses de edad, viéndose incrementados con el progreso de la patología. Estos déficits se evidencian en pruebas como el Rota-Rod, *Pole test*, *Hanging wire* o fuerza de agarre (452, 453). Estudios en primates también demuestran alteraciones motoras provocadas por las proteinopatías TDP43 (454). Un aspecto realmente interesante en los modelos TDP43 es que existen diferencias en cuanto al sexo, viéndose atenuado el fenotipo motor en las hembras (455).

El modelo L-BMAA muestra alteraciones funcionales en pruebas como el Rota-Rod o en el Análisis de las Pisadas, pero estas alteraciones no llegan a ser significativas (261, 368), sin embargo, estos animales sí muestran diferencias en la evaluación neurológica realizada mediante el estudio de la ambulación, la prueba de suspensión de la cola y las pruebas de fuerza donde mostraban cambios que difieren según la fase en la que se encuentren estos animales (238, 365). En estudios realizados en estos animales con diferentes dosis no encontraron alteraciones en las pruebas de Plano Inclinado (305) al igual que sucede en nuestros animales.

Todos estos resultados parecen indicar que es necesario un periodo más extenso de estudio para poder visualizar cambios en la clínica de los animales tratados con LCR-ELA ya que los resultados parecen significar que se encuentran en un estadio presintomático.

Comparativa de la infusión de LCR-ELA aguda y crónica

Teniendo en cuenta los resultados previos obtenidos en este estudio, y tomando en consideración los datos ya publicados anteriormente (274), cabe hacer una comparación entre ambos modelos utilizados en este proyecto. En ambos modelos se encuentran diferencias histológicas y electrofisiológicas que recapitulan lo encontrado en humanos.

Resultados previos demostraban que las alteraciones histológicas cuando la administración es de mayor duración comienzan en los primeros días de administración y que al cesar dicha administración y estudiar su evolución estas alteraciones se mantenían, sin presentar alteraciones clínicas (274). Otros estudios, en los que se administraba el LCR de pacientes de forma puntual demostraban al igual que con la infusión continua cambios histológicos, así como alteraciones eléctricas compatibles con esta patología (270, 271, 273).

En este estudio, los cambios histológicos son más acusados cuando la administración del LCR es aguda, observándose una neuroinflamación más evidente que en la infusión crónica, así como una mayor neurodegeneración y un aumento mayor de las inclusiones intracitoplasmáticas. Además, esta administración aguda provoca unas alteraciones electrofisiológicas que, en comparación con la administración crónica, son más acusadas. Por lo que se consideraría que esta aproximación sería más adecuada para el estudio de esta patología debido a que puede estar más cercana a la clínica humana. Los hallazgos en el modelo crónico parecen indicar que existe un evento de habituación o plasticidad tras la infusión continua de tres bombas intracerebroventriculares, observándose que el animal no alcanza a desarrollar un cuadro clínico que correlacione con los datos observados en la histopatología.

Limitaciones del estudio

Las principales limitaciones del estudio fueron las siguientes:

En este estudio se utilizan LCR de pacientes de ELA. El LCR es un fluido biológico valioso y limitado debido a que su obtención se realiza mediante una técnica invasiva y, además el volumen extraído es limitado. Así mismo, a pesar de que los LCR utilizados en los Grupos Citotóxicos eran todos citotóxicos, no todas las muestras presentan el mismo grado de citotoxicidad. Por otro lado, la composición del LCR es desconocida y ciertos elementos moleculares podrían variar en función de cada paciente. Es por ello que en este estudio, se utilizó un *pool* de LCR para evitar los sesgos por variación de la citotoxicidad o composición. Sin embargo, la principal limitación relativa a los LCR es la imposibilidad de replicar los estudios con los mismos LCR, debido al poco volumen del que se dispone.

En este estudio se han utilizado 17 animales para el Modelo Agudo y 30 para el Modelo Crónico. Los animales presentan una alta variabilidad individual que afecta a la significancia en los análisis estadísticos. Para evitar esta variabilidad individual sería necesario aumentar el número de animales en ambos modelos.

Por último, existen ciertas limitaciones que podrían alterar la metodología del estudio, entre ellas tenemos la propia implantación de las bombas osmóticas ya que se colocan intraescapularmente y por el movimiento propio del animal puede provocar la separación entre la bomba y el catéter. Por su parte la manipulación ventricular podría generar hidrocefalia transitoria y ventriculitis, las cuales serían capaces de explicar algunos de los cambios inflamatorios descritos.

Por otro lado, durante la electromiografía, los electrodos tanto de registro como de estimulación son introducidos manualmente y esto implica una posible variabilidad en cuanto al punto exacto de colocación de los mismos, lo que puede alterar la respuesta obtenida. Sumado a esto, el estimulador utilizado durante todo el estudio es manual, lo que podría alterar la exactitud de las intensidades o frecuencias con la que los estímulos son aportados. Por último, otro de los aspectos a tener en cuenta es que la adición de anestesia puede provocar la reducción de la respuesta tanto de la onda M como del reflejo H (456), esto fue algo que durante los inicios del estudio sucedió, lo que nos llevó a reducir el nivel de anestesia de mantenimiento durante los registros electromiográficos.

Perspectivas futuras

Es evidente que los datos presentados en este estudio son el inicio de la descripción de un modelo de ELA esporádica. Nuestros datos muestran que la administración de LCR citotóxico mediante bombas implantadas en el ventrículo lateral de ratas Wistar, induce daños en células microgliales y astrocitarias, siendo característicos de procesos neuroinflamatorios, además de pérdida de neuronas ChAT (menor número de células, y mayor expresión de caspasa3) correlacionando estos datos con afectaciones de la onda H y M, lo que nos indica que es un modelo que se puede aproximar a la patología esporádica de la ELA. Por lo que, el diseño y análisis de nuevos experimentos serán necesarios para confirmar la infusión intracerebral de líquido cefalorraquídeo de pacientes de Esclerosis Lateral Amiotrófica en rata puede ser un utilizado como un modelo de difusión de la enfermedad.

Entre estos estudios se encontrarían principalmente un aumento del número de animales, así como introducir nuevos grupos de estudio. Además, sería interesante aumentar el tiempo de estudio para poder evaluar las implicaciones clínicas en estos animales, o variar el tiempo de infusión prolongándolo para así conseguir evocar los déficits clínicos.

Así mismo, lo que ampliaría en gran medida el conocimiento sobre este modelo, sería analizar exhaustivamente la composición del LCR para poder conocer cuál es el causante de la citotoxicidad, así como, aumentar los estudios post mortem para evaluar si existen otros factores que pudiesen explicar la neuroinflamación observada.

Por último, es interesante destacar que este proyecto pretende generar una aproximación experimental para el estudio de la patología esporádica, sin embargo, todavía son necesarios mayores estudios para caracterizar en su totalidad el modelo, previo a una posible aplicación traslacional ya sea para el estudio de fármacos o búsqueda de biomarcadores tempranos de esta patología.

CONCLUSIONES

En vista de los resultados obtenidos en este proyecto y tras su comparativa con la bibliografía previa podemos concluir:

- El líquido cefalorraquídeo de algunos pacientes de ELA es citotóxico para las motoneuronas en cultivo.
- La infusión intracerebroventricular, tanto aguda como prolongada, de líquido cefalorraquídeo citotóxico de pacientes de ELA en rata, provoca alteraciones histológicas en la corteza motora y en los segmentos cervicales y lumbares de la médula espinal, compatibles con lo hallado en la patología humana.

Los principales hallazgos neuropatológicos fueron:

- Un aumento de la neuroinflamación, caracterizado por un aumento de la microgliosis, mostrando un fenotipo M1 activado, así como por un aumento de la astrogliosis.
- Un aumento de la neurodegeneración, evidenciado mediante una reducción de las neuronas en general, y motoneuronas en particular, aumento de la vía extrínseca de la apoptosis y presencia de inclusiones intracitoplasmáticas en las motoneuronas.
- La infusión intracerebroventricular, tanto aguda como prolongada, de líquido cefalorraquídeo citotóxico de pacientes de ELA en rata, provoca alteraciones electrofisiológicas en las motoneuronas espinales que correlacionan con la histología.

Los principales hallazgos electrofisiológicos fueron:

- Se ha observado una destrucción neuronal caracterizada por un aumento de la intensidad umbral de la onda M, así como por un descenso de su amplitud, a lo largo de los estudios de los animales con LCR-ELA.
- Se han observado alteraciones en la funcionalidad de las sinapsis, evidenciadas por la afectación de la onda H.
- La infusión intracerebroventricular continua y prolongada de líquido cefalorraquídeo, tanto Citotóxico como No Citotóxico, de pacientes de ELA en rata no provoca alteraciones clínicas ni en la coordinación motora ni en la fuerza de los animales, por lo que se considera que es un modelo de difusión de la patología, pero no la causante de ella.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

La Esclerosis Lateral Amiotrófica es un desorden neurodegenerativo, progresivo e incapacitante, caracterizada por la degeneración de las motoneuronas superiores de la corteza cerebral, las motoneuronas inferiores del tronco cerebral y motoneuronas de la médula espinal. La edad de inicio de esta enfermedad es variable, generalmente, suele originarse en la edad adulta, en torno a los 40-60 años.

La neuropatología asociada a esta enfermedad presenta diferentes aspectos, como pueden ser la degeneración de las motoneuronas, las inclusiones intracitoplasmáticas y la neuroinflamación, caracterizada por aumento de la microgliosis y astrogliosis, tanto de la corteza motora como de la médula espinal. En la actualidad se desconocen los mecanismos que subyacen el inicio de esta enfermedad, sin embargo, las investigaciones realizadas durante los últimos años han permitido determinar ciertos mecanismos que están involucrados en la ELA, entre ellos se encuentran el estrés oxidativo, la desregulación del tráfico axonal, la excitotoxicidad mediada por glutamato, alteraciones en el metabolismo del ARN y alteraciones en la homeostasis proteica.

El diagnóstico de esta patología se realiza a través de los criterios de El Escorial Revisados y de los criterios de Awaji, que aumentan el valor de la electrofisiología para el diagnóstico de la ELA. Una de las pruebas electrofisiológicas utilizadas para evaluar la excitabilidad de las motoneuronas, así como la fisiología básica de los reflejos de los segmentos espinales, además de su relación con ciertos signos clínicos de diversos síndromes de motoneurona superior, es el reflejo de Hoffmann o reflejo H. Esta técnica se basa en estimular eléctricamente las fibras sensoriales en un nervio periférico y registrar el reflejo de respuesta en el músculo homónimo.

Se han desarrollado numerosos modelos animales para el estudio de esta enfermedad, prácticamente todos basados en las mutaciones causantes de la patología familiar, esto hace que estos modelos no representen a la mayoría de los pacientes, ya que el 90% de ellos presentan una patología esporádica.

El LCR de los pacientes de ELA ha demostrado ser citotóxico para las motoneuronas en cultivo, lo que hizo plantear que el LCR podría ser un medio de difusión de la enfermedad y, que la infusión continua de este LCR intraventricular en roedores sería un buen modelo para estudiar la patología esporádica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para este estudio, se han diseñado dos modelos animales en rata, uno Agudo y otro Crónico, para evaluar el efecto tanto neuropatológico como electrofisiológico de la administración, vía intracerebroventricular, de LCR Citotóxico de pacientes de ELA. En el Modelo Agudo se procedió a implantar una mini bomba osmótica ALZET® modelo 1002, rellena de LCR Control o LCR Citotóxico respectivamente, consiguiendo una infusión continua durante 14 días. Por su parte en el Modelo crónico se implantaron 3 bombas osmóticas ALZET® modelo 2002, rellenas de LCR Control, LCR No Citotóxico y LCR Citotóxico respectivamente, con ello se mantuvo una infusión continua durante 42 días.

Durante todo el periodo de estudio, a los animales se les realizó semanalmente un EMG para evaluar los cambios en el reflejo H producidos por la infusión del LCR correspondiente. En cada EMG se procedió a realizar dos protocolos, uno de intensidades y otro de frecuencias, para ver como afectaba la intensidad y frecuencia del estímulo a las amplitudes de las ondas M y H del sóleo.

A los animales del Modelo Crónico también se les realizaron pruebas de comportamiento, para evaluar las características clínicas que presentaban. Concretamente, se realizaron los test de Matsumoto, Plano Inclinado y el Análisis de las huellas.

Finalizado el periodo de infusión, se procedió al sacrificio de los animales mediante perfusión intracardiaca y se extrajeron tanto el cerebro como la médula espinal para realizar los estudios neuropatológicos. Se realizaron cortes de 30 μm , tanto de las regiones de corteza motora, como de los segmentos cervicales y lumbares de la médula espinal.

Tras ello, se realizaron inmunohistoquímicas para evaluar, tanto el proceso neurodegenerativo (se utilizaron marcadores de neuronas y motoneuronas, así como marcadores de inclusiones y apoptosis), como el proceso neuroinflamatorio (utilizando marcadores de microglía y astrocitos, además, en el Modelo Crónico se analizó la polarización de la microglía). Todos los resultados inmunohistoquímicos se revelaron mediante microscopía confocal y posteriormente se analizaron mediante el software ImageJ v. 1.8.

Para los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVAS y T-Test a través de los softwares *IBM SPSS statistics 25* y *GraphPad Prism 8*.

RESULTADOS

Todos los animales incluidos en este estudio sobrevivieron al implante de la bomba osmótica y en ningún momento del estudio presentaron signos de infección, ni convulsiones, agresividad, piloerección o postración, todos ellos signos o síntomas relacionados con el dolor y sufrimiento. En los estudios electrofisiológicos tampoco hubo complicaciones, no viéndose afectados en ningún momento por la anestesia inhalatoria con isoflurano.

Los resultados histológicos han mostrado que en el Modelo Agudo existe un proceso neuroinflamatorio activo, tanto en la corteza motora como en la médula espinal, encontrándose un aumento de la microgliosis, que además presentaba un fenotipo activado. Además, en ambos tejidos también se observó un aumento de la astrogliosis. Por otro lado, en este modelo se evidenció un proceso neurodegenerativo caracterizado por una reducción en el número de neuronas general y más concretamente, una pérdida motoneuronal. Sumado a esto las motoneuronas que sobrevivieron mostraban un aumento de las inclusiones intracitoplasmáticas.

Por su parte, los resultados histológico han mostrado, que en el Modelo Crónico existe un proceso neuroinflamatorio activo tanto en la corteza motora como en la médula espinal, encontrándose un aumento de la microgliosis, que además, presentaba un fenotipo activado, que al analizarlo de forma más profunda, indicaba que en el Grupo No citotóxico esta microglía activada está en un fenotipo antiinflamatorio, mientras que la del Grupo Citotóxico presentaba un fenotipo proinflamatorio. Así mismo, queda demostrado un aumento del marcaje de MHCII. Además, en ambos tejidos también se observó un aumento de la astrogliosis. Por otro lado, en este modelo se evidenció un proceso neurodegenerativo caracterizado por una reducción en el número de neuronas general, y más concretamente, una pérdida motoneuronal. Sumado a esto las motoneuronas que sobrevivían mostraban un aumento de las inclusiones intracitoplasmáticas.

Los resultados electrofisiológicos han demostrado que existe alteración de las ondas M y H, en ambos modelos. Se observan alteraciones en tanto en la onda M indicativo de una pérdida motora directa, así como en la onda H lo que indica alteraciones en las sinapsis con las neuronas aferentes lo que presenta relación con lo encontrado en la histología.

Los resultados relativos a las características clínicas indicaron que, los animales del Modelo Crónico no mostraban alteraciones en ninguna de las pruebas realizadas, indicativo de que estos animales no presentaban alteraciones funcionales en este periodo de estudio.

DISCUSIÓN

Actualmente no existe ningún modelo animal que represente en su totalidad a la patología de la ELA, además hay que tener en cuenta que la mayoría de los modelos generados hasta el momento están basados en las mutaciones que provocan las variantes familiares y que solo representan al 10% de los casos. Es por ello, que la búsqueda de un modelo que represente a la patología esporádica es de vital importancia.

El principal hallazgo encontrado en estos modelos es una activación del proceso neuroinflamatorio, así como una marcada neurodegeneración tanto en la corteza motora como en la médula espinal. Estos dos hallazgos son dos de las principales características observadas en los pacientes de ELA, así como en los modelos animales.

Así mismo, se encuentran alteraciones electrofisiológicas que correlacionan con la degeneración neuronal observada en los resultados histológicos. Se han observado alteraciones, en tanto en la onda M, indicativo de una pérdida motora directa, como en la onda H, lo que indica alteraciones en las sinapsis con las neuronas aferentes lo que presenta relación con lo encontrado en la histología. Estos resultados corroboran lo encontrado en los pacientes de ELA, así como en modelos animales en los que se observan alteraciones en este reflejo y en otros estudios electrofisiológicos.

La infusión del LCR en el ventrículo lateral durante el periodo de estudio no altera la clínica de los animales, lo que indicaría que estos animales podrían encontrarse en una fase presintomática de la patología y sería necesario un mayor tiempo de estudio para evidenciar la afectación clínica.

CONCLUSIONES

El líquido cefalorraquídeo de algunos pacientes de ELA es citotóxico para las motoneuronas en cultivo.

La infusión intracerebroventricular continua, tanto aguda como prolongada de líquido cefalorraquídeo citotóxico de pacientes de ELA en rata provoca alteraciones histológicas en la corteza motora y en los segmentos cervicales y lumbares de la médula espinal compatibles con lo hallado en la patología humana.

La infusión intracerebroventricular continua, tanto aguda como prolongada de líquido cefalorraquídeo citotóxico de pacientes de ELA en rata provoca alteraciones electrofisiológicas en las motoneuronas espinales que correlacionan con la histología.

La infusión intracerebroventricular continua y prolongada de líquido cefalorraquídeo tanto Citotóxico como No Citotóxico de pacientes de ELA en rata no provoca alteraciones clínicas ni en la coordinación motora ni en la fuerza de los animales, por lo que se considera que es un modelo de difusión de la patología, pero no la causante de ella.

ABSTRACT

INTRODUCTION

Amyotrophic lateral sclerosis is a progressive and disabling neurodegenerative disorder characterized by degeneration of the upper motor neurons of the cerebral cortex, the lower motor neurons of the brain stem and motor neurons of the spinal cord. The age of onset of this disease is variable; generally, it usually originates in adulthood, around 40-60 years of age.

The neuropathology associated with this disease presents different aspects such as motor neuron degeneration, intracytoplasmic inclusions and neuroinflammation characterized by increased microgliosis and astrogliosis in both motor cortex and spinal cord. The mechanisms underlying the onset of this disease are currently unknown; however, research carried out in recent years has made it possible to determine certain mechanisms involved in ALS, including oxidative stress, deregulation of axonal trafficking, glutamate-mediated excitotoxicity, alterations in ARN metabolism and alterations in protein homeostasis.

The diagnosis of this pathology is made through the Revised El Escorial criteria and the Awaji criteria, which increase the value of electrophysiology for the diagnosis of ALS. One of the electrophysiological tests used to assess motor neuron excitability, as well as the basic physiology of spinal segment reflexes, in addition to their relationship to certain clinical signs of various upper motor neuron syndromes, is the Hoffmann reflex or H-reflex. This technique is based on electrically stimulating sensory fibers Ia in a peripheral nerve and recording the reflex response in the homonymous muscle.

Numerous animal models have been developed for the study of this disease, practically all of them based on the mutations causing the familial pathology, which means that these models do not represent the majority of patients, since 90% of them present a sporadic pathology.

CSF from ALS patients has been shown to be cytotoxic to motor neurons in culture, which led to the suggestion that CSF could be a means of dissemination of the disease and that continuous infusion of this intraventricular CSF in rodents would be a good model to study sporadic pathology.

MATERIAL AND METHODS

For this study, two animal models were designed in rats, one Acute and the other Chronic, to evaluate the neuropathological and electrophysiological effect of intracerebroventricular administration of Cytotoxic CSF in ALS patients. In the Acute Model, an ALZET® model 1002 osmotic pump was implanted, filled with Control CSF or Cytotoxic CSF respectively, achieving a continuous infusion for 14 days. In the chronic model, 3 ALZET® model 2002 osmotic pumps were implanted, filled with Control CSF, Non-Cytotoxic CSF and Cytotoxic CSF respectively, thus maintaining a continuous infusion for 42 days.

Throughout the study period, the animals underwent weekly EMG to evaluate the changes in the H reflex produced by the infusion of the corresponding CSF. In each EMG, two protocols were performed, one of intensities and the other of frequencies, to see how the intensity and frequency of the stimulus affected the amplitudes of the soleus M and H waves.

The animals in the Chronic Model also underwent behavioral tests to evaluate the clinical characteristics presented by the animals. Specifically, the Matsumoto, Inclined Plane and Footprint Analysis tests were performed.

At the end of the infusion period, the animals were sacrificed by intracardiac perfusion and the brain and spinal cord were extracted for neuropathological studies. Thirty μm slices were taken from the motor cortex regions as well as from the cervical and lumbar segments of the spinal cord.

Following these, immunohistochemistry was performed to evaluate both the neurodegenerative process (markers of neurons and motor neurons were used, as well as markers of inclusions and apoptosis), and the neuroinflammatory process (using markers of microglia and astrocytes; in addition, in the Chronic Model the polarization of microglia is analyzed). All immunohistochemical results were revealed by confocal microscopy and subsequently analyzed using *ImageJ v. 1.8* software.

Statistical analyses were performed by ANOVAS and T-Test using *IBM SPSS statistics 25* and *GraphPad Prism 8* software.

RESULTS

All the animals included in this study survived the implantation of the osmotic pump and at no time during the study showed signs of infection, convulsions, aggressiveness, piloerection or prostration, all of them signs or symptoms related to pain and suffering. There were no complications in the electrophysiological studies, and they were not affected at any time by inhalation anesthesia with isoflurane.

The histological results show that in the acute model there is an active neuroinflammatory process in both the motor cortex and the spinal cord, finding an increase in microgliosis, which also presented an activated phenotype. In addition, an increase in astrogliosis was also observed in both tissues. On the other hand, in this model a neurodegenerative process characterized by a reduction in the general number of neurons and more specifically a motoneuronal loss is evidenced. In addition, the surviving motor neurons show an increase in intracytoplasmic inclusions.

On the other hand, histological results show that in the Chronic Model there is an active neuroinflammatory process in both the motor cortex and the spinal cord, finding an increase in microgliosis, which also presented an activated phenotype that when analyzed more deeply indicates that in the Non-cytotoxic Group this activated microglia is in an anti-inflammatory phenotype while that of the Cytotoxic Group presents a proinflammatory phenotype. Likewise, an increase in MHCII labeling is demonstrated. In addition, an increase in astrogliosis is also observed in both tissues. On the other hand, in this model a neurodegenerative process characterized by a reduction in the general number of neurons and more specifically a motoneuronal loss is evidenced. In addition, the surviving motor neurons show an increase in intracytoplasmic inclusions.

The electrophysiological results show that there are alterations in the M and H waves in both models. Alterations are observed in both the M wave indicative of a direct motor loss, as well as in the H wave indicating alterations in the synapses with afferent neurons, which is related to what was found in the histology.

The results related to the clinical characteristics indicated that the animals of the Chronic Model did not show alterations in any of the tests performed, indicating that these animals do not present functional alterations in this study period.

DISCUSSION

There is currently no animal model that fully represents the pathology of ALS, and it should also be taken into account that most of the models generated so far are based on mutations that cause familial variants and that only represent 10% of the cases. This is why the search for a model that represents sporadic pathology is of vital importance.

The main finding found in these models is an activation of the neuroinflammatory process as well as a marked neurodegeneration in both the motor cortex and the spinal cord. These two findings are two of the main characteristics observed in ALS patients as well as in animal models.

Likewise, electrophysiological alterations are found that correlate with the neuronal degeneration observed in the histological results. Alterations are observed in both the M wave indicating a direct motor loss, as well as in the H wave indicating alterations in the synapses with afferent neurons, which is related to the histological findings. These results corroborate what has been found in ALS patients, as well as in animal models in which alterations in this reflex are observed and in other electrophysiological studies.

The infusion of CSF into the lateral ventricle during the study period does not alter the clinical manifestations of the animals, which would indicate that these animals could be in a presymptomatic phase of the pathology and that a longer study time would be necessary to demonstrate clinical involvement.

CONCLUSIONS

Cerebrospinal fluid from some ALS patients is cytotoxic to cultured motor neurons.

Acute and prolonged continuous intracerebroventricular infusion of cytotoxic cerebrospinal fluid from ALS patients in rats causes histological alterations in the motor cortex and cervical and lumbar segments of the spinal cord consistent with those found in human pathology.

Continuous intracerebroventricular infusion, both acute and prolonged, of cytotoxic cerebrospinal fluid from ALS patients in rat causes electrophysiological alterations in spinal motor neurons that correlate with histology.

Prolonged continuous intracerebroventricular infusion of both Cytotoxic and Non-Cytotoxic cerebrospinal fluid from ALS patients in rats does not cause clinical alterations in either motor coordination or strength in the animals, thus it is considered to be a model of diffusion of the pathology, but not the cause of the pathology.

REFERENCIAS

1. Hulisz D. Amyotrophic lateral sclerosis: disease state overview. *Am J Manag Care.* 2018;24(15):S320-S6.
2. Goetz CG. Amyotrophic lateral sclerosis: early contributions of Jean-Martin Charcot. *Muscle Nerve.* 2000;23(3):336-43.
3. Taylor JP BRJ, Cleveland DW. Decoding ALS: from genes to mechanism. *Nature.* 2016;539(7628):197-206.
4. Grad L, I RGA, Ravits J, Cashman N. R. Clinical Spectrum of Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2017;7(8).
5. Robberecht W, Philips T. The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurosci.* 2013;14(4):248-64.
6. Chen L. FUS mutation is probably the most common pathogenic gene for JALS, especially sporadic JALS. *Rev Neurol (Paris).* 2021;177(4):333-40.
7. Xu L, Liu T, Liu L, Yao X, Chen L, Fan D, et al. Global variation in prevalence and incidence of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol.* 2020;267(4):944-53.
8. Longinetti E, Fang F. Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: an update of recent literature. *Curr Opin Neurol.* 2019;32(5):771-6.
9. Palese F, Sartori A, Verriello L, Ros S, Passadore P, Manganotti P, et al. Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis in Friuli-Venezia Giulia, North-Eastern Italy, 2002–2014: a retrospective population-based study. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration.* 2019;20(1-2):90-9.
10. Lara A, Esperante I, Meyer M, Liere P, Di Giorgio N, Schumacher M, et al. Neuroprotective Effects of Testosterone in Male Wobbler Mouse, a Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Mol Neurobiol.* 2021;58(5):2088-106.
11. Niedermeyer S, Murn M, Choi PJ. Respiratory Failure in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Chest.* 2019;155(2):401-8.
12. Masrori P, Van Damme P. Amyotrophic lateral sclerosis: a clinical review. *Eur J Neurol.* 2020;27(10):1918-29.
13. Salameh JS, Brown RH, Jr., Berry JD. Amyotrophic Lateral Sclerosis: Review. *Semin Neurol.* 2015;35(4):469-76.
14. Dávila LG. ESTUDIO DE LA NEUROGÉNESIS EN NECROPSIAS PROCEDENTES DE PACIENTES CON ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA: Universidad Complutense de Madrid; 2016.

15. McDonald TS, Kumar V, Fung JN, Woodruff TM, Lee JD. Glucose clearance and uptake is increased in the SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis through an insulin-independent mechanism. *FASEB J.* 2021;35(7):e21707.
16. Johnson IP, Roodveldt C. Commentary: Immunochemical Markers of the Amyloid Cascade in the Hippocampus in Motor Neuron Diseases. *Frontiers in Neurology.* 2017;8(105).
17. Borrego-Ecija S, Turon-Sans J, Ximelis T, Aldecoa I, Molina-Porcel L, Povedano M, et al. Cognitive decline in amyotrophic lateral sclerosis: Neuropathological substrate and genetic determinants. *Brain Pathol.* 2021;31(3):e12942.
18. Swinnen B, Robberecht W. The phenotypic variability of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurol.* 2014;10(11):661-70.
19. Casterton RL, Hunt RJ, Fanto M. Pathomechanism Heterogeneity in the Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia Disease Spectrum: Providing Focus Through the Lens of Autophagy. *J Mol Biol.* 2020;432(8):2692-713.
20. Jack J. Chen PBBFF. Overview of Current and Emerging Therapies for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Supplements and Featured Publications.* 2020;26(9).
21. Saberi S, Stauffer JE, Schulte DJ, Ravits J. Neuropathology of Amyotrophic Lateral Sclerosis and Its Variants. *Neurol Clin.* 2015;33(4):855-76.
22. Hardiman O, Al-Chalabi A, Chio A, Corr EM, Logroscino G, Robberecht W, et al. Amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Dis Primers.* 2017;3:17071.
23. Norris SP, Likanje MN, Andrews JA. Amyotrophic lateral sclerosis: update on clinical management. *Curr Opin Neurol.* 2020;33(5):641-8.
24. Brown RH, Al-Chalabi A. Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N Engl J Med.* 2017;377(2):162-72.
25. Arora RD, Khan YS. Motor Neuron Disease. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.; 2021.
26. Brotman RG, Moreno-Escobar MC, Joseph J, Pawar G. Amyotrophic Lateral Sclerosis. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.; 2021.
27. Stephens B, Guiloff RJ, Navarrete R, Newman P, Nikhar N, Lewis P. Widespread loss of neuronal populations in the spinal ventral horn in sporadic motor neuron disease. A morphometric study. *Journal of the Neurological Sciences.* 2006;244(1):41-58.

28. Javier MP. Esclerosis lateral amiotrófica: una actualización. *Revista Mexicana de Neurociencia*. 2009;10(4):281-6.
29. Hooten KG, Beers DR, Zhao W, Appel SH. Protective and Toxic Neuroinflammation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotherapeutics*. 2015;12(2):364-75.
30. Ciryam P, Lambert-Smith IA, Bean DM, Freer R, Cid F, Tartaglia GG, et al. Spinal motor neuron protein supersaturation patterns are associated with inclusion body formation in ALS. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(20):E3935-E43.
31. Malik R, Wiedau M. Therapeutic Approaches Targeting Protein Aggregation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2020;13.
32. Beckers J, Tharkeshwar AK, Van Damme P. C9orf72 ALS-FTD: recent evidence for dysregulation of the autophagy-lysosome pathway at multiple levels. *Autophagy*. 2021:1-17.
33. Oskarsson B, Gendron TF, Staff NP. Amyotrophic Lateral Sclerosis: An Update for 2018. *Mayo Clin Proc*. 2018;93(11):1617-28.
34. Atkin G, Paulson H. Ubiquitin pathways in neurodegenerative disease. *Front Mol Neurosci*. 2014;7:63.
35. de Boer EMJ, Orié VK, Williams T, Baker MR, De Oliveira HM, Polvikoski T, et al. TDP-43 proteinopathies: a new wave of neurodegenerative diseases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2020.
36. Forsberg K, Graffmo K, Pakkenberg B, Weber M, Nielsen M, Marklund S, et al. Misfolded SOD1 inclusions in patients with mutations in C9orf72 and other ALS/FTD-associated genes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2019;90(8):861-9.
37. Da Cruz S, Bui A, Saberi S, Lee SK, Stauffer J, McAlonis-Downes M, et al. Misfolded SOD1 is not a primary component of sporadic ALS. *Acta Neuropathol*. 2017;134(1):97-111.
38. Mackenzie IR, Ansorge O, Strong M, Bilbao J, Zinman L, Ang LC, et al. Pathological heterogeneity in amyotrophic lateral sclerosis with FUS mutations: two distinct patterns correlating with disease severity and mutation. *Acta Neuropathol*. 2011;122(1):87-98.
39. Ikenaka K, Ishigaki S, Iguchi Y, Kawai K, Fujioka Y, Yokoi S, et al. Characteristic Features of FUS Inclusions in Spinal Motor Neurons of Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2020;79(4):370-7.
40. Lee YB, Baskaran P, Gomez-Deza J, Chen HJ, Nishimura AL, Smith BN, et al. C9orf72 poly GA RAN-translated protein plays a key role in amyotrophic lateral sclerosis via aggregation and toxicity. *Hum Mol Genet*. 2017;26(24):4765-77.
41. Okamoto K, Mizuno Y, Fujita Y. Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathology*. 2008;28(2):109-15.

42. 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.
43. Mizuno Y, Fujita Y, Takatama M, Okamoto K. Peripherin partially localizes in Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci.* 2011;302(1-2):14-8.
44. Cipollina G, Davari Serej A, Di Nolfi G, Gazzano A, Marsala A, Spatafora MG, et al. Heterogeneity of Neuroinflammatory Responses in Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Challenge or an Opportunity? *Int J Mol Sci.* 2020;21(21).
45. Zhao W, Beers DR, Appel SH. Immune-mediated mechanisms in the pathoprogression of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2013;8(4):888-99.
46. Piancone F, La Rosa F, Marventano I, Saresella M, Clerici M. The Role of the Inflammasome in Neurodegenerative Diseases. *Molecules.* 2021;26(4).
47. Frakes AE, Ferraiuolo L, Haidet-Phillips AM, Schmelzer L, Braun L, Miranda CJ, et al. Microglia induce motor neuron death via the classical NF-kappaB pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron.* 2014;81(5):1009-23.
48. Kwon HS, Koh SH. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. *Transl Neurodegener.* 2020;9(1):42.
49. Geloso MC, Corvino V, Marchese E, Serrano A, Michetti F, D'Ambrosi N. The Dual Role of Microglia in ALS: Mechanisms and Therapeutic Approaches. *Front Aging Neurosci.* 2017;9:242.
50. Hristovska I, Pascual O. Deciphering Resting Microglial Morphology and Process Motility from a Synaptic Prospect. *Front Integr Neurosci.* 2015;9:73.
51. Kandel ER. *Principles of Neural Science* [5th Ed]: Mc Graw Hill Medical; 2013.
52. Rodrigues Lima-Junior J, Sulzer D, Lindestam Arlehamn CS, Sette A. The role of immune-mediated alterations and disorders in ALS disease. *Hum Immunol.* 2021;82(3):155-61.
53. Pena-Altamira E, Prati F, Massenzio F, Virgili M, Contestabile A, Bolognesi ML, et al. Changing paradigm to target microglia in neurodegenerative diseases: from anti-inflammatory strategy to active immunomodulation. *Expert Opin Ther Targets.* 2016;20(5):627-40.
54. Jurga AM, Paleczna M, Kuter KZ. Overview of General and Discriminating Markers of Differential Microglia Phenotypes. *Front Cell Neurosci.* 2020;14:198.
55. Lyon MS, Wosiski-Kuhn M, Gillespie R, Caress J, Milligan C. Inflammation, Immunity, and amyotrophic lateral sclerosis: I. Etiology and pathology. *Muscle Nerve.* 2019;59(1):10-22.
56. Henkel JS, Beers DR, Zhao W, Appel SH. Microglia in ALS: the good, the bad, and the resting. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2009;4(4):389-98.

57. Parisi C, Napoli G, Pelegrin P, Volonte C. M1 and M2 Functional Imprinting of Primary Microglia: Role of P2X7 Activation and miR-125b. *Mediators Inflamm.* 2016;2016:2989548.
58. Evans MC, Couch Y, Sibson N, Turner MR. Inflammation and neurovascular changes in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Cell Neurosci.* 2013;53:34-41.
59. Otani K, Shichita T. Cerebral sterile inflammation in neurodegenerative diseases. *Inflamm Regen.* 2020;40(1):28.
60. Jara JH, Genc B, Stanford MJ, Pytel P, Roos RP, Weintraub S, et al. Evidence for an early innate immune response in the motor cortex of ALS. *J Neuroinflammation.* 2017;14(1):129.
61. Tang Y, Le W. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol.* 2016;53(2):1181-94.
62. Cigdem Acioglu LL, Stella Elkabes. Contribution of astrocytes to neuropathology of neurodegenerative diseases. *Brain Res.* 2021;1758:147291.
63. Crabe R, Aimond F, Gosset P, Scamps F, Raoul C. How Degeneration of Cells Surrounding Motoneurons Contributes to Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Cells.* 2020;9(12).
64. Ding ZB, Song LJ, Wang Q, Kumar G, Yan YQ, Ma CG. Astrocytes: a double-edged sword in neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res.* 2021;16(9):1702-10.
65. Verkhatsky A, Nedergaard M. Physiology of Astroglia. *Physiol Rev.* 2018;98(1):239-389.
66. Pekny M, Pekna M. Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. *Physiol Rev.* 2014;94(4):1077-98.
67. Matias I, Morgado J, Gomes FCA. Astrocyte Heterogeneity: Impact to Brain Aging and Disease. *Front Aging Neurosci.* 2019;11:59.
68. Vasile F, Dossi E, Rouach N. Human astrocytes: structure and functions in the healthy brain. *Brain Struct Funct.* 2017;222(5):2017-29.
69. Verkhatsky A, Zorec R, Parpura V. Stratification of astrocytes in healthy and diseased brain. *Brain Pathol.* 2017;27(5):629-44.
70. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 2010;119(1):7-35.
71. Lines J, Martin ED, Kofuji P, Aguilar J, Araque A. Astrocytes modulate sensory-evoked neuronal network activity. *Nature Communications.* 2020;11(1):3689.
72. Parpura V, Heneka MT, Montana V, Oliet SH, Schousboe A, Haydon PG, et al. Glial cells in (patho)physiology. *J Neurochem.* 2012;121(1):4-27.

73. Sofroniew MV. Astrogliosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;7(2):a020420.
74. Escartin C, Galea E, Lakatos A, O'Callaghan JP, Petzold GC, Serrano-Pozo A, et al. Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nat Neurosci.* 2021;24(3):312-25.
75. Pekny M, Pekna M, Messing A, Steinhauser C, Lee JM, Parpura V, et al. Astrocytes: a central element in neurological diseases. *Acta Neuropathol.* 2016;131(3):323-45.
76. Liddelow SA, Barres BA. Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity.* 2017;46(6):957-67.
77. Li K, Li J, Zheng J, Qin S. Reactive Astrocytes in Neurodegenerative Diseases. *Aging Dis.* 2019;10(3):664-75.
78. Valori CF, Brambilla L, Martorana F, Rossi D. The multifaceted role of glial cells in amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71(2):287-97.
79. Staats KA, Van Den Bosch L. Astrocytes in amyotrophic lateral sclerosis: direct effects on motor neuron survival. *J Biol Phys.* 2009;35(4):337-46.
80. Verkhratsky A, Parpura V, Pekna M, Pekny M, Sofroniew M. Glia in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Biochem Soc Trans.* 2014;42(5):1291-301.
81. Johnson JO, Chia R, Miller DE, Li R, Kumaran R, Abramzon Y, et al. Association of Variants in the SPTLC1 Gene With Juvenile Amyotrophic Lateral Sclerosis. *JAMA Neurol.* 2021.
82. Johnson JH, Al Khalili Y. *Histology, Myelin.* StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
- Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.; 2021.
83. Gacem N, Nait-Oumesmar B. Oligodendrocyte Development and Regenerative Therapeutics in Multiple Sclerosis. *Life (Basel).* 2021;11(4).
84. Bradl M, Lassmann H. Oligodendrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 2010;119(1):37-53.
85. Menn B, Garcia-Verdugo JM, Yaschine C, Gonzalez-Perez O, Rowitch D, Alvarez-Buylla A. Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *J Neurosci.* 2006;26(30):7907-18.
86. Fletcher JL, Makowiecki K, Cullen CL, Young KM. Oligodendrogenesis and myelination regulate cortical development, plasticity and circuit function. *Semin Cell Dev Biol.* 2021;118:14-23.
87. Simons M, Nave KA. Oligodendrocytes: Myelination and Axonal Support. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;8(1):a020479.

88. Kipp M. Oligodendrocyte Physiology and Pathology Function. *Cells*. 2020;9(9).
89. McTigue DM, Tripathi RB. The life, death, and replacement of oligodendrocytes in the adult CNS. *J Neurochem*. 2008;107(1):1-19.
90. Fünfschilling U, Supplie LM, Mahad D, Boretius S, Saab AS, Edgar J, et al. Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity. *Nature*. 2012;485(7399):517-21.
91. Domingues HS, Portugal CC, Socodato R, Relvas JB. Oligodendrocyte, Astrocyte, and Microglia Crosstalk in Myelin Development, Damage, and Repair. *Front Cell Dev Biol*. 2016;4:71.
92. Moore S, Meschkat M, Ruhwedel T, Trevisiol A, Tzvetanova ID, Battfeld A, et al. A role of oligodendrocytes in information processing. *Nat Commun*. 2020;11(1):5497.
93. Raffaele S, Boccazzi M, Fumagalli M. Oligodendrocyte Dysfunction in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Mechanisms and Therapeutic Perspectives. *Cells*. 2021;10(3).
94. Lorente Pons A, Higginbottom A, Cooper-Knock J, Alrafiah A, Alofi E, Kirby J, et al. Oligodendrocyte pathology exceeds axonal pathology in white matter in human amyotrophic lateral sclerosis. *J Pathol*. 2020;251(3):262-71.
95. Traiffort E, Morisset-Lopez S, Moussaed M, Zahaf A. Defective Oligodendroglial Lineage and Demyelination in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Int J Mol Sci*. 2021;22(7).
96. Le Gall L, Anakor E, Connolly O, Vijayakumar UG, Duddy WJ, Duguez S. Molecular and Cellular Mechanisms Affected in ALS. *J Pers Med*. 2020;10(3).
97. Hemerkova P, Valis M. Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis: Antioxidant Metalloenzymes and Therapeutic Strategies. *Biomolecules*. 2021;11(3).
98. Mejzini R, Flynn LL, Pitout IL, Fletcher S, Wilton SD, Akkari PA. ALS Genetics, Mechanisms, and Therapeutics: Where Are We Now? *Front Neurosci*. 2019;13:1310.
99. Cunha-Oliveira T, Montezinho L, Mendes C, Firuzi O, Saso L, Oliveira PJ, et al. Oxidative Stress in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Pathophysiology and Opportunities for Pharmacological Intervention. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020:5021694.
100. Harley J, Clarke BE, Patani R. The Interplay of RNA Binding Proteins, Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in ALS. *Antioxidants (Basel)*. 2021;10(4).
101. Morgan S, Orrell RW. Pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Br Med Bull*. 2016;119(1):87-98.

102. Rojas P, Ramirez AI, Fernandez-Albarral JA, Lopez-Cuenca I, Salobrar-Garcia E, Cadena M, et al. Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Neurodegenerative Motor Neuron Disease With Ocular Involvement. *Front Neurosci.* 2020;14:566858.
103. Cluskey S RD. Mechanisms of neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Pathol.* 2001;54(6):386-92.
104. Redler RL, Dokholyan NV. The complex molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2012;107:215-62.
105. Bunton-Stasyshyn RK, Saccon RA, Fratta P, Fisher EM. SOD1 Function and Its Implications for Amyotrophic Lateral Sclerosis Pathology: New and Renascent Themes. *Neuroscientist.* 2015;21(5):519-29.
106. Peters OM, Ghasemi M, Brown RH, Jr. Emerging mechanisms of molecular pathology in ALS. *J Clin Invest.* 2015;125(5):1767-79.
107. Méndez-López I, Sancho-Bielsa FJ, Engel T, García AG, Padín JF. Progressive Mitochondrial SOD1G93A Accumulation Causes Severe Structural, Metabolic and Functional Aberrations through OPA1 Down-Regulation in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *International Journal of Molecular Sciences.* 2021;22(15):8194.
108. Guo W, Stoklund Dittlau K, Van Den Bosch L. Axonal transport defects and neurodegeneration: Molecular mechanisms and therapeutic implications. *Semin Cell Dev Biol.* 2020;99:133-50.
109. Magrané J MG. Mitochondrial function, morphology, and axonal transport in amyotrophic lateral sclerosis. *Antioxid Redox Signal.* 2009;11(7):1615-26.
110. Didonna A, Opal P. The role of neurofilament aggregation in neurodegeneration: lessons from rare inherited neurological disorders. *Mol Neurodegener.* 2019;14(1):19.
111. Wang B, Huang M, Shang D, Yan X, Zhao B, Zhang X. Mitochondrial Behavior in Axon Degeneration and Regeneration. *Front Aging Neurosci.* 2021;13:650038.
112. King AE, Woodhouse A, Kirkcaldie MT, Vickers JC. Excitotoxicity in ALS: Overstimulation, or overreaction? *Exp Neurol.* 2016;275 Pt 1:162-71.
113. Armada-Moreira A, Gomes JI, Pina CC, Savchak OK, Goncalves-Ribeiro J, Rei N, et al. Going the Extra (Synaptic) Mile: Excitotoxicity as the Road Toward Neurodegenerative Diseases. *Front Cell Neurosci.* 2020;14:90.
114. Batra G, Jain M, Singh RS, Sharma AR, Singh A, Prakash A, et al. Novel therapeutic targets for amyotrophic lateral sclerosis. *Indian J Pharmacol.* 2019;51(6):418-25.

115. Jiang LL, Zhu B, Zhao Y, Li X, Liu T, Pina-Crespo J, et al. Membralin deficiency dysregulates astrocytic glutamate homeostasis leading to ALS-like impairment. *J Clin Invest.* 2019;129(8):3103-20.
116. Madji Hounoum B, Blasco H, Coque E, Vourc'h P, Emond P, Corcia P, et al. The Metabolic Disturbances of Motoneurons Exposed to Glutamate. *Mol Neurobiol.* 2018;55(10):7669-76.
117. Kim W, Kim DY, Lee KH. RNA-Binding Proteins and the Complex Pathophysiology of ALS. *Int J Mol Sci.* 2021;22(5).
118. Lin C-LG, Bristol LA, Jin L, Dykes-Hoberg M, Crawford T, Clawson 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(3):589-602.
119. Dudman J, Qi X. Stress Granule Dysregulation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front Cell Neurosci.* 2020;14:598517.
120. Wolozin B, Ivanov P. Stress granules and neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci.* 2019;20(11):649-66.
121. Campos-Melo D, Hawley ZCE, Droppelmann CA, Strong MJ. The Integral Role of RNA in Stress Granule Formation and Function. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:621779.
122. Medinas DB, Valenzuela V, Hetz C. Proteostasis disturbance in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet.* 2017;26(R2):R91-R104.
123. Webster CP, Smith EF, Shaw PJ, De Vos KJ. Protein Homeostasis in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Therapeutic Opportunities? *Front Mol Neurosci.* 2017;10:123.
124. Chua JP, De Calbiac H, Kabashi E, Barmada SJ. Autophagy and ALS: mechanistic insights and therapeutic implications. *Autophagy.* 2021:1-29.
125. Al-Chalabi A, Hardiman O, Kiernan MC, Chiò A, Rix-Brooks B, van den Berg LH. Amyotrophic lateral sclerosis: moving towards a new classification system. *The Lancet Neurology.* 2016;15(11):1182-94.
126. Zufiria M, Gil-Bea FJ, Fernandez-Torron R, Poza JJ, Munoz-Blanco JL, Rojas-Garcia R, et al. ALS: A bucket of genes, environment, metabolism and unknown ingredients. *Prog Neurobiol.* 2016;142:104-29.
127. Daniel R, Rosen TS, David Patterson, Denise A. Figlewicz, Peter Sapp, Afif Hentati, Deirdre Donaldson, Jun Goto, Jeremiah P. O'Regan, Han-Xiang Deng, Zohra Rahmani, Aldis Krizus, Diane McKenna-Yasek, Annarueber Cayabyab, Sandra M. Gaston, Ralph Berger, Rudolph E. Tanzi, John J. Halperin, Brian Herzfeldt, Raymond Van den Bergh, Wu-Yen Hung, Thomas Bird, Gang Deng, Donald W. Mulder, Celestine Smyth, Nigel G. Laing, Edwin Soriano, Margaret A. Pericak-Vance, Jonathan Haines, Guy A. Rouleau, James S. Gusella, H. Robert Horvitz & Robert H. Brown Jr. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature.* 1993;362:59-62.

128. Harms MB, Baloh RH. Clinical neurogenetics: amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Clin.* 2013;31(4):929-50.
129. Kim G, Gautier O, Tassoni-Tsuchida E, Ma XR, Gitler AD. ALS Genetics: Gains, Losses, and Implications for Future Therapies. *Neuron.* 2020;108(5):822-42.
130. Henden L, Twine NA, Szul P, McCann EP, Nicholson GA, Rowe DB, et al. Identity by descent analysis identifies founder events and links SOD1 familial and sporadic ALS cases. *NPJ Genom Med.* 2020;5:32.
131. Elis Cristina Araujo Eleutherio RSM, Aline de Araújo, Brasil JRMN, Luan de Holanda Paranhos. SOD1, more than just an antioxidant. *Arch Biochem Biophys.* 2021;697:108701.
132. Kaur SJ, McKeown SR, Rashid S. Mutant SOD1 mediated pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Gene.* 2016;577(2):109-18.
133. Choi ES, Dokholyan NV. SOD1 oligomers in amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Opin Struct Biol.* 2021;66:225-30.
134. PM A. Amyotrophic lateral sclerosis associated with mutations in the CuZn superoxide dismutase gene. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2006;6(1):37-46.
135. Saccon RA, Bunton-Stasyshyn RK, Fisher EM, Fratta P. Is SOD1 loss of function involved in amyotrophic lateral sclerosis? *Brain.* 2013;136(Pt 8):2342-58.
136. Butti Z, Patten SA. RNA Dysregulation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front Genet.* 2018;9:712.
137. Pham J, Keon M, Brennan S, Saksena N. Connecting RNA-Modifying Similarities of TDP-43, FUS, and SOD1 with MicroRNA Dysregulation Amidst A Renewed Network Perspective of Amyotrophic Lateral Sclerosis Proteinopathy. *Int J Mol Sci.* 2020;21(10).
138. Agosta F, Spinelli EG, Marjanovic IV, Stevic Z, Pagani E, Valsasina P, et al. Unraveling ALS due to SOD1 mutation through the combination of brain and cervical cord MRI. *Neurology.* 2018;90(8):e707-e16.
139. Chen HJ, Mitchell JC. Mechanisms of TDP-43 Proteinopathy Onset and Propagation. *Int J Mol Sci.* 2021;22(11).
140. Jo M, Lee S, Jeon YM, Kim S, Kwon Y, Kim HJ. The role of TDP-43 propagation in neurodegenerative diseases: integrating insights from clinical and experimental studies. *Exp Mol Med.* 2020;52(10):1652-62.
141. Ure JA. TDP-43 y su incidencia en demencias degenerativas. *Neurología Argentina.* 2021;13(1):37-47.

142. Aksoy YA, Deng W, Stoddart J, Chung R, Guillemin G, Cole NJ, et al. "STRESSED OUT": The role of FUS and TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2020;126:105821.
143. Riku Y, Seilhean D, Duyckaerts C, Boluda S, Iguchi Y, Ishigaki S, et al. Pathway from TDP-43-Related Pathology to Neuronal Dysfunction in Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Lobar Degeneration. *Int J Mol Sci.* 2021;22(8).
144. Ferrer I, Andres-Benito P, Carmona M, Assialioui A, Povedano M. TDP-43 Vasculopathy in the Spinal Cord in Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis (sALS) and Frontal Cortex in sALS/FTLD-TDP. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2021;80(3):229-39.
145. Chen C, Ding X, Akram N, Xue S, Luo SZ. Fused in Sarcoma: Properties, Self-Assembly and Correlation with Neurodegenerative Diseases. *Molecules.* 2019;24(8).
146. Arenas A, Chen J, Kuang L, Barnett KR, Kasarskis EJ, Gal J, et al. Lysine acetylation regulates the RNA binding, subcellular localization and inclusion formation of FUS. *Hum Mol Genet.* 2020;29(16):2684-97.
147. Mackenzie IRA, Neumann M. Fused in Sarcoma Neuropathology in Neurodegenerative Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2017;7(12).
148. Prashad S, Gopal PP. RNA-binding proteins in neurological development and disease. *RNA Biol.* 2021;18(7):972-87.
149. Birsa N, Bentham MP, Fratta P. Cytoplasmic functions of TDP-43 and FUS and their role in ALS. *Semin Cell Dev Biol.* 2020;99:193-201.
150. Zhou B, Wang H, Cai Y, Wen H, Wang L, Zhu M, et al. FUS P525L mutation causing amyotrophic lateral sclerosis and movement disorders. *Brain Behav.* 2020;10(6):e01625.
151. Naumann M, Peikert K, Gunther R, van der Kooi AJ, Aronica E, Hubers A, et al. Phenotypes and malignancy risk of different FUS mutations in genetic amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Clin Transl Neurol.* 2019;6(12):2384-94.
152. Tanemoto M, Hisahara S, Ikeda K, Yokokawa K, Manabe T, Tsuda R, et al. Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis Due to a FUS P525L Mutation with Asymmetric Muscle Weakness and Anti-ganglioside Antibodies. *Intern Med.* 2021;60(12):1949-53.
153. Zhou Y, Liu S, Ozturk A, Hicks GG. FUS-regulated RNA metabolism and DNA damage repair: Implications for amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia pathogenesis. *Rare Dis.* 2014;2:e29515.
154. DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Rutherford NJ, et al. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron.* 2011;72(2):245-56.

155. Renton AE, Majounie E, Waite A, Simón-Sánchez J, Rollinson S, Gibbs JR, et al. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron*. 2011;72(2):257-68.
156. Hao Z, Liu L, Tao Z, Wang R, Ren H, Sun H, et al. Motor dysfunction and neurodegeneration in a C9orf72 mouse line expressing poly-PR. *Nat Commun*. 2019;10(1):2906.
157. Pang W, Hu F. Cellular and physiological functions of C9ORF72 and implications for ALS/FTD. *J Neurochem*. 2021;157(3):334-50.
158. Hautbergue GM, Cleary JD, Guo S, Ranum LPW. Therapeutic strategies for C9orf72 amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Curr Opin Neurol*. 2021.
159. Gagliardi D, Costamagna G, Taiana M, Andreoli L, Biella F, Bersani M, et al. Insights into disease mechanisms and potential therapeutics for C9orf72-related amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal dementia. *Ageing Res Rev*. 2020;64:101172.
160. Smeyers J, Banchi EG, Latouche M. C9ORF72: What It Is, What It Does, and Why It Matters. *Front Cell Neurosci*. 2021;15:661447.
161. LaClair KD, Zhou Q, Michaelsen M, Wefers B, Brill MS, Janjic A, et al. Congenic expression of poly-GA but not poly-PR in mice triggers selective neuron loss and interferon responses found in C9orf72 ALS. *Acta Neuropathol*. 2020;140(2):121-42.
162. Lai JD, Ichida JK. C9ORF72 protein function and immune dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett*. 2019;713:134523.
163. Zhu Q, Jiang J, Gendron TF, McAlonis-Downes M, Jiang L, Taylor A, et al. Reduced C9ORF72 function exacerbates gain of toxicity from ALS/FTD-causing repeat expansion in C9orf72. *Nat Neurosci*. 2020;23(5):615-24.
164. Xu X, Su Y, Zou Z, Zhou Y, Yan J. Correlation between C9ORF72 mutation and neurodegenerative diseases: A comprehensive review of the literature. *International Journal of Medical Sciences*. 2021;18(2):378-86.
165. Yang Q, Jiao B, Shen L. The Development of C9orf72-Related Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia Disorders. *Front Genet*. 2020;11:562758.
166. Lafarga V, Sirozh O, Diaz-Lopez I, Galarreta A, Hisaoka M, Zarzuela E, et al. Widespread displacement of DNA- and RNA-binding factors underlies toxicity of arginine-rich cell-penetrating peptides. *EMBO J*. 2021;40(13):e103311.
167. Vatsavayai SC, Nana AL, Yokoyama JS, Seeley WW. C9orf72-FTD/ALS pathogenesis: evidence from human neuropathological studies. *Acta Neuropathol*. 2019;137(1):1-26.
168. Ajroud-Driss S, Siddique T. Sporadic and hereditary amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Biochim Biophys Acta*. 2015;1852(4):679-84.

169. Oskarsson B, Horton DK, Mitsumoto H. Potential Environmental Factors in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurol Clin.* 2015;33(4):877-88.
170. Perez Gomez AA, Karmakar M, Carroll RJ, Lawley KS, Amstalden K, Young CR, et al. Genetic and immunological contributors to virus-induced paralysis. *Brain, Behavior, & Immunity - Health.* 2021;18:100395.
171. D'Amico E, Factor-Litvak P, Santella RM, Mitsumoto H. Clinical perspective on oxidative stress in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radic Biol Med.* 2013;65:509-27.
172. Bozzoni V PO, Diamanti L, Nosari G, Cereda C, Ceroni M. Amyotrophic lateral sclerosis and environmental factors. *Funct Neurol.* 2016;31:13.
173. Andrew AS, Bradley WG, Peipert D, Butt T, Amoako K, Pioro EP, et al. Risk factors for amyotrophic lateral sclerosis: A regional United States case-control study. *Muscle Nerve.* 2021;63(1):52-9.
174. Jankovska N, Matej R. Molecular Pathology of ALS: What We Currently Know and What Important Information Is Still Missing. *Diagnostics (Basel).* 2021;11(8).
175. Daoud H, Valdmanis PN, Kabashi E, Dion P, Dupre N, Camu W, et al. Contribution of TARDBP mutations to sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Med Genet.* 2009;46(2):112-4.
176. Feng F, Wang H, Liu J, Wang Z, Xu B, Zhao K, et al. Genetic and clinical features of Chinese sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients with TARDBP mutations. *Brain Behav.* 2021;11(8):e2312.
177. Rademakers R, Stewart H, DeJesus-Hernandez M, Krieger C, Graff-Radford N, Fabros M, et al. Fus gene mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve.* 2010;42(2):170-6.
178. Mackenzie IR, Bigio EH, Ince PG, Geser F, Neumann M, Cairns NJ, et al. Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations. *Ann Neurol.* 2007;61(5):427-34.
179. Pamphlett R, Luquin N, McLean C, Jew SK, Adams L. TDP-43 neuropathology is similar in sporadic amyotrophic lateral sclerosis with or without TDP-43 mutations. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2009;35(2):222-5.
180. Liu ZJ, Lin HX, Liu GL, Tao QQ, Ni W, Xiao BG, et al. The investigation of genetic and clinical features in Chinese patients with juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Genet.* 2017;92(3):267-73.
181. Paul Orban RSD, Michael R. Hayden, Blair R. Leavitt. Chapter 15 Juvenile amyotrophic lateral sclerosis. In: Andrew A. Eisen PJS, editor. *Handbook of Clinical Neurology.* 82: Elsevier; 2007. p. 301-12.

182. Morris J. Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) and Related Motor Neuron Diseases: An Overview. *Neurodiagn J*. 2015;55(3):180-94.
183. Kiernan MC, Vucic S, Cheah BC, Turner MR, Eisen A, Hardiman O, et al. Amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet*. 2011;377(9769):942-55.
184. Brooks BR MR, Swash M, Munsat TL; World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases. El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*. 2000;1(5):293-9.
185. de Carvalho M, Dengler R, Eisen A, England JD, Kaji R, Kimura J, et al. Electrodiagnostic criteria for diagnosis of ALS. *Clin Neurophysiol*. 2008;119(3):497-503.
186. de Carvalho M. Electrodiagnosis of Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Review of Existing Guidelines. *J Clin Neurophysiol*. 2020;37(4):294-8.
187. Mazzini L, Balzarini C. An overview of H-reflex studies in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Motor Neuron Disorders*. 2000;1(5):313-8.
188. Drory VE KI, Groozman GB. Electrophysiologic evaluation of upper motor neuron involvement in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*. 2001;2:8.
189. Misiaszek JE. The H-reflex as a tool in neurophysiology: Its limitations and uses in understanding nervous system function. *Muscle & Nerve*. 2003;28(2):144-60.
190. Knikou M. The H-reflex as a probe: pathways and pitfalls. *J Neurosci Methods*. 2008;171(1):1-12.
191. Burke D. Clinical uses of H reflexes of upper and lower limb muscles. *Clin Neurophysiol Pract*. 2016;1:9-17.
192. Schieppati M NA, Poloni M. Changes in the normal pattern of H-reflex inhibition during muscle release in ALS. *Adv Exp Med Biol*. 1987;209:4.
193. WB M. Ratio of maximum H reflex to maximum M response as a measure of spasticity. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1966;29(3):201-4.
194. Mazzini L BC, Gareri F, Brigatti M. H-reflex changes in the course of amyotrophic lateral sclerosis. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1997;104:7.
195. Libonati L, Barone TF, Ceccanti M, Cambieri C, Tartaglia G, Onesti E, et al. Heteronymous H reflex in temporal muscle as sign of hyperexcitability in ALS patients. *Clin Neurophysiol*. 2019;130(8):1455-9.

196. Chenot Q, Tzourio-Mazoyer N, Rheault F, Descoteaux M, Crivello F, Zago L, et al. A population-based atlas of the human pyramidal tract in 410 healthy participants. *Brain Struct Funct.* 2019;224(2):599-612.
197. AbuHasan Q, Munakomi S. *Neuroanatomy, Pyramidal Tract.* StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
- Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.; 2021.
198. Natali AL, Reddy V, Bordoni B. *Neuroanatomy, Corticospinal Cord Tract.* StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
- Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.; 2021.
199. Cuadrado ML, Arias JA, Palomar MA, Linares R. [The pyramidal tract: new pathways]. *Rev Neurol.* 2001;32(12):1151-8.
200. Roos PM. Chapter 10 - Metals and Motor Neuron Disease. In: White AR, Aschner M, Costa LG, Bush AI, editors. *Biometals in Neurodegenerative Diseases: Academic Press; 2017.* p. 175-93.
201. Rajagopalan V, Piro EP. Corticospinal Tract and Related Grey Matter Morphometric Shape Analysis in ALS Phenotypes: A Fractal Dimension Study. *Brain Sci.* 2021;11(3).
202. Menon P, Vucic S. The Upper Motor Neuron-Improved Knowledge from ALS and Related Clinical Disorders. *Brain Sci.* 2021;11(8).
203. Gabel MC, Broad RJ, Young AL, Abrahams S, Bastin ME, Menke RAL, et al. Evolution of white matter damage in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Clin Transl Neurol.* 2020;7(5):722-32.
204. Cheng L, Yuan Y, Tang X, Zhou Y, Luo C, Liu D, et al. Structural and functional underpinnings of precentral abnormalities in amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurol.* 2021;28(5):1528-36.
205. Falconer D. Wobbler (wr). *Mouse News Lett.* 1956;15:22.
206. Ott B, Dahlke C, Meller K, Napirei M, Schmitt-John T, Brand-Saberi B, et al. Implementation of a manual for working with wobbler mice and criteria for discontinuation of the experiment. *Ann Anat.* 2015;200:118-24.
207. Moser JM, Bigini P, Schmitt-John T. The wobbler mouse, an ALS animal model. *Mol Genet Genomics.* 2013;288(5-6):207-29.
208. Schmitt-John T. VPS54 and the wobbler mouse. *Front Neurosci.* 2015;9:381.
209. Broch-Lips M, Pedersen TH, Riisager A, Schmitt-John T, Nielsen OB. Neuro-muscular function in the wobbler murine model of primary motor neuronopathy. *Exp Neurol.* 2013;248:406-15.

210. Broch-Lips M, Pedersen TH, Riisager A, Schmitt-John T, Nielsen OB. Neuro-muscular function in the wobbler murine model of primary motor neuronopathy. *Experimental Neurology*. 2013;248:406-15.
211. Cihankaya H, Theiss C, Matschke V. Little Helpers or Mean Rogue-Role of Microglia in Animal Models of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Int J Mol Sci*. 2021;22(3).
212. Patel PH, Wilkinson EC, Starke EL, McGimsey MR, Blankenship JT, Barbee SA. Vps54 regulates *Drosophila* neuromuscular junction development and interacts genetically with Rab7 to control composition of the postsynaptic density. *Biol Open*. 2020;9(8).
213. Boillée S PM, Junier MP. The wobbler mouse: a neurodegeneration jigsaw puzzle. *Mol Neurobiol*. 2003;28:42.
214. Meyer M, Kruse MS, Garay L, Lima A, Roig P, Hunt H, et al. Long-term effects of the glucocorticoid receptor modulator CORT113176 in murine motoneuron degeneration. *Brain Res*. 2020;1727:146551.
215. De Nicola AF, Meyer M, Garay L, Kruse MS, Schumacher M, Guennoun R, et al. Progesterone and Allopregnanolone Neuroprotective Effects in the Wobbler Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Cell Mol Neurobiol*. 2021.
216. Zwilling M, Theiss C, Matschke V. Caffeine and NAD(+) Improve Motor Neural Integrity of Dissociated Wobbler Cells In Vitro. *Antioxidants (Basel)*. 2020;9(6).
217. Andreasen SR, Lundbye CJ, Christensen TB, Thielsen KD, Schmitt-John T, Holm MM. Excitatory-inhibitory imbalance in the brain of the wobbler mouse model of amyotrophic lateral sclerosis substantiated by riluzole and diazepam. *Neurosci Lett*. 2017;658:85-90.
218. De Nicola AF, Meyer M, Guennoun R, Schumacher M, Hunt H, Belanoff J, et al. Insights into the Therapeutic Potential of Glucocorticoid Receptor Modulators for Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci*. 2020;21(6).
219. Mancuso R, Navarro X. Amyotrophic lateral sclerosis: Current perspectives from basic research to the clinic. *Prog Neurobiol*. 2015;133:1-26.
220. Picher-Martel V, Valdmanis PN, Gould PV, Julien JP, Dupre N. From animal models to human disease: a genetic approach for personalized medicine in ALS. *Acta Neuropathol Commun*. 2016;4(1):70.
221. Fogarty MJ, Mu EWH, Lavidis NA, Noakes PG, Bellingham MC. Motor Areas Show Altered Dendritic Structure in an Amyotrophic Lateral Sclerosis Mouse Model. *Front Neurosci*. 2017;11:609.
222. Ramírez-Jarquín UN, Rojas F, van Zundert B, Tapia R. Chronic infusion of SOD1G93A astrocyte-secreted factors induces spinal motoneuron degeneration and neuromuscular dysfunction in healthy rats. *Journal of Cellular Physiology*. 2017;232(10):2610-5.

223. Lutz C. Mouse models of ALS: Past, present and future. *Brain Res.* 2018;1693(Pt A):1-10.
224. Spalloni A, Longone P. Cognitive impairment in amyotrophic lateral sclerosis, clues from the SOD1 mouse. *Neurosci Biobehav Rev.* 2016;60:12-25.
225. Keskin I, Ekhtiari Bidhendi E, Marklund M, Andersen PM, Brannstrom T, Marklund SL, et al. Peripheral administration of SOD1 aggregates does not transmit pathogenic aggregation to the CNS of SOD1 transgenic mice. *Acta Neuropathol Commun.* 2021;9(1):111.
226. Philips T, Rothstein JD. Rodent Models of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Curr Protoc Pharmacol.* 2015;69:5 67 1-5 21.
227. Gois AM, Mendonca DMF, Freire MAM, Santos JR. In Vitro and in Vivo Models of Amyotrophic Lateral Sclerosis: An Updated Overview. *Brain Res Bull.* 2020;159:32-43.
228. Marcuzzo S, Bonanno S, Figini M, Scotti A, Zucca I, Minati L, et al. A longitudinal DTI and histological study of the spinal cord reveals early pathological alterations in G93A-SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol.* 2017;293:43-52.
229. Park KH. Mechanisms of Muscle Denervation in Aging: Insights from a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Aging Dis.* 2015;6(5):380-9.
230. Seven YB, Nichols NL, Kelly MN, Hobson OR, Satriotomo I, Mitchell GS. Compensatory plasticity in diaphragm and intercostal muscle utilization in a rat model of ALS. *Exp Neurol.* 2018;299(Pt A):148-56.
231. Wier CG, Crum AE, Reynolds AB, Iyer CC, Chugh D, Palettas MS, et al. Muscle contractility dysfunction precedes loss of motor unit connectivity in SOD1(G93A) mice. *Muscle Nerve.* 2019;59(2):254-62.
232. Nomura E, Ohta Y, Tadokoro K, Shang J, Feng T, Liu X, et al. Imaging Hypoxic Stress and the Treatment of Amyotrophic Lateral Sclerosis with Dimethyloxalylglycine in a Mice Model. *Neuroscience.* 2019;415:31-43.
233. Jiang MC, Adimula A, Birch D, Heckman CJ. Hyperexcitability in synaptic and firing activities of spinal motoneurons in an adult mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience.* 2017;362:33-46.
234. Chen L, Na R, Danae McLane K, Thompson CS, Gao J, Wang X, et al. Overexpression of ferroptosis defense enzyme Gpx4 retards motor neuron disease of SOD1G93A mice. *Sci Rep.* 2021;11(1):12890.
235. Wong PC, Pardo CA, Borchelt DR, Lee MK, Copeland NG, Jenkins NA, et al. An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron.* 1995;14(6):1105-16.

236. El Oussini H, Scekcic-Zahirovic J, Vercruyssen P, Marques C, Dirrig-Grosch S, Dieterle S, et al. Degeneration of serotonin neurons triggers spasticity in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*. 2017;82(3):444-56.
237. Martineau E, Di Polo A, Vande Velde C, Robitaille R. Sex-Specific Differences in Motor-Unit Remodeling in a Mouse Model of ALS. *eNeuro*. 2020;7(1).
238. de Munck E, Munoz-Saez E, Miguel BG, Solas MT, Martinez A, Arahuetes RM. Morphometric and neurochemical alterations found in l-BMAA treated rats. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2015;39(3):1232-45.
239. Fabrizio P, Apolloni S, Bianchi A, Salvatori I, Valle C, Lanzuolo C, et al. P2X7 activation enhances skeletal muscle metabolism and regeneration in SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Pathol*. 2020;30(2):272-82.
240. McGoldrick P, Joyce PI, Fisher EM, Greensmith L. Rodent models of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1832(9):1421-36.
241. Archbold HC, Jackson KL, Arora A, Weskamp K, Tank EM, Li X, et al. TDP43 nuclear export and neurodegeneration in models of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Sci Rep*. 2018;8(1):4606.
242. Williamson MG, Finelli MJ, Sleight JN, Reddington A, Gordon D, Talbot K, et al. Neuronal over-expression of *Oxr1* is protective against ALS-associated mutant TDP-43 mislocalisation in motor neurons and neuromuscular defects in vivo. *Hum Mol Genet*. 2019;28(21):3584-99.
243. Wegorzewska I, Bell S, Cairns NJ, Miller TM, Baloh RH. TDP-43 mutant transgenic mice develop features of ALS and frontotemporal lobar degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(44):18809-14.
244. Dance A. TDP-43 models coverage. *J Alzheimers Dis*. 2010;21(4):1403-8.
245. Gendron TF, Petrucelli L. Rodent models of TDP-43 proteinopathy: investigating the mechanisms of TDP-43-mediated neurodegeneration. *J Mol Neurosci*. 2011;45(3):486-99.
246. Xu YF, Prudencio M, Hubbard JM, Tong J, Whitelaw EC, Jansen-West K, et al. The pathological phenotypes of human TDP-43 transgenic mouse models are independent of downregulation of mouse *Tdp-43*. *PLoS One*. 2013;8(7):e69864.
247. Ke YD, van Hummel A, Stevens CH, Gladbach A, Ippati S, Bi M, et al. Short-term suppression of A315T mutant human TDP-43 expression improves functional deficits in a novel inducible transgenic mouse model of FTLD-TDP and ALS. *Acta Neuropathol*. 2015;130(5):661-78.
248. Scekcic-Zahirovic J, Oussini HE, Mersmann S, Drenner K, Wagner M, Sun Y, et al. Motor neuron intrinsic and extrinsic mechanisms contribute to the pathogenesis of FUS-associated amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol*. 2017;133(6):887-906.

249. Huang C, Zhou H, Tong J, Chen H, Liu YJ, Wang D, et al. FUS transgenic rats develop the phenotypes of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration. *PLoS Genet.* 2011;7(3):e1002011.
250. Devoy A, Kalmar B, Stewart M, Park H, Burke B, Noy SJ, et al. Humanized mutant FUS drives progressive motor neuron degeneration without aggregation in 'FUSDelta14' knockin mice. *Brain.* 2017;140(11):2797-805.
251. Van Den Bosch L. Genetic rodent models of amyotrophic lateral sclerosis. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:348765.
252. Nolan M, Talbot K, Ansorge O. Pathogenesis of FUS-associated ALS and FTD: insights from rodent models. *Acta Neuropathol Commun.* 2016;4(1):99.
253. Funikov SY, Rezykh AP, Mazin PV, Morozov AV, Maltsev AV, Chicheva MM, et al. FUS(1-359) transgenic mice as a model of ALS: pathophysiological and molecular aspects of the proteinopathy. *Neurogenetics.* 2018;19(3):189-204.
254. Rossaert E, Pollari E, Jaspers T, Van Helleputte L, Jarpe M, Van Damme P, et al. Restoration of histone acetylation ameliorates disease and metabolic abnormalities in a FUS mouse model. *Acta Neuropathol Commun.* 2019;7(1):107.
255. Koppers M, Blokhuis AM, Westeneng HJ, Terpstra ML, Zundel CA, Vieira de Sa R, et al. C9orf72 ablation in mice does not cause motor neuron degeneration or motor deficits. *Ann Neurol.* 2015;78(3):426-38.
256. Jiang J, Zhu Q, Gendron TF, Saberi S, McAlonis-Downes M, Seelman A, et al. Gain of Toxicity from ALS/FTD-Linked Repeat Expansions in C9ORF72 Is Alleviated by Antisense Oligonucleotides Targeting GGGGCC-Containing RNAs. *Neuron.* 2016;90(3):535-50.
257. Batra R, Lee CW. Mouse Models of C9orf72 Hexanucleotide Repeat Expansion in Amyotrophic Lateral Sclerosis/ Frontotemporal Dementia. *Front Cell Neurosci.* 2017;11:196.
258. Liu Y, Pattamatta A, Zu T, Reid T, Bardhi O, Borchelt David R, et al. C9orf72 BAC Mouse Model with Motor Deficits and Neurodegenerative Features of ALS/FTD. *Neuron.* 2016;90(3):521-34.
259. Choi SY, Lopez-Gonzalez R, Krishnan G, Phillips HL, Li AN, Seeley WW, et al. C9ORF72-ALS/FTD-associated poly(GR) binds Atp5a1 and compromises mitochondrial function in vivo. *Nat Neurosci.* 2019;22(6):851-62.
260. Banack SA, Caller TA, Stommel EW. The cyanobacteria derived toxin Beta-N-methylamino-L-alanine and amyotrophic lateral sclerosis. *Toxins (Basel).* 2010;2(12):2837-50.
261. de Munck E, Muñoz-Sáez E, Miguel BG, Solas MT, Ojeda I, Martínez A, et al. β -N-methylamino- L -alanine causes neurological and pathological phenotypes mimicking Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS): The first step towards an experimental model for sporadic ALS. *Environmental Toxicology and Pharmacology.* 2013;36(2):243-55.

262. Lee M, McGeer PL. Weak BMAA toxicity compares with that of the dietary supplement beta-alanine. *Neurobiology of Aging*. 2012;33(7):1440-7.
263. Tedeschi V, Petrozziello T, Sisalli MJ, Boscia F, Canzoniero LMT, Secondo A. The activation of Mucolipin TRP channel 1 (TRPML1) protects motor neurons from L-BMAA neurotoxicity by promoting autophagic clearance. *Sci Rep*. 2019;9(1):10743.
264. Ng Kee Kwong KC, Gregory JM, Pal S, Chandran S, Mehta AR. Cerebrospinal fluid cytotoxicity in amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review of in vitro studies. *Brain Commun*. 2020;2(2):fcaa121.
265. Smith R, Myers K, Ravits J, Bowser R. Amyotrophic lateral sclerosis: Is the spinal fluid pathway involved in seeding and spread? *Med Hypotheses*. 2015;85(5):576-83.
266. Matías-Guiu J, Galán L, García-Ramos R, Barcia JA, Guerrero A. La citotoxicidad del líquido cefalorraquídeo en la esclerosis lateral amiotrófica. *Neurología*. 2010;25(6):364-73.
267. Ng Kee Kwong KC, Harbham PK, Selvaraj BT, Gregory JM, Pal S, Hardingham GE, et al. 40 Years of CSF Toxicity Studies in ALS: What Have We Learnt About ALS Pathophysiology? *Front Mol Neurosci*. 2021;14:647895.
268. Galan L, Gomez-Pinedo U, Guerrero A, Garcia-Verdugo JM, Matias-Guiu J. Amyotrophic lateral sclerosis modifies progenitor neural proliferation in adult classic neurogenic brain niches. *BMC Neurol*. 2017;17(1):173.
269. Galan L, Matias-Guiu J, Matias-Guiu JA, Yanez M, Pytel V, Guerrero-Sola A, et al. Cerebrospinal fluid cytotoxicity does not affect survival in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neurol Scand*. 2017;136(3):212-6.
270. Sankaranarayani R, Nalini A, Rao Laxmi T, Raju TR. Altered neuronal activities in the motor cortex with impaired motor performance in adult rats observed after infusion of cerebrospinal fluid from amyotrophic lateral sclerosis patients. *Behav Brain Res*. 2010;206(1):109-19.
271. Gunasekaran R, Narayani RS, Vijayalakshmi K, Alladi PA, Shobha K, Nalini A, et al. Exposure to cerebrospinal fluid of sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients alters Nav1.6 and Kv1.6 channel expression in rat spinal motor neurons. *Brain Res*. 2009;1255:170-9.
272. Vijayalakshmi K, Alladi PA, Ghosh S, Prasanna VK, Sagar BC, Nalini A, et al. Evidence of endoplasmic reticular stress in the spinal motor neurons exposed to CSF from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurobiol Dis*. 2011;41(3):695-705.
273. Shanmukha S, Narayanappa G, Nalini A, Alladi PA, Raju TR. Sporadic amyotrophic lateral sclerosis (SALS) – skeletal muscle response to cerebrospinal fluid from SALS patients in a rat model. *Disease Models & Mechanisms*. 2018;11(4).
274. Gómez-Pinedo U, Galán L, Yañez M, Matias-Guiu J, Valencia C, Guerrero-Sola A, et al. Histological changes in the rat brain and spinal cord following prolonged intracerebroventricular

infusion of cerebrospinal fluid from amyotrophic lateral sclerosis patients are similar to those caused by the disease. *Neurología (English Edition)*. 2018;33(4):211-23.

275. Mishra PS, Boutej H, Soucy G, Bareil C, Kumar S, Picher-Martel V, et al. Transmission of ALS pathogenesis by the cerebrospinal fluid. *Acta Neuropathol Commun*. 2020;8(1):65.

276. Yáñez M, Galán L, Matías-Guiu J, Vela A, Guerrero A, García AG. CSF from amyotrophic lateral sclerosis patients produces glutamate independent death of rat motor brain cortical neurons: Protection by resveratrol but not riluzole. *Brain Research*. 2011;1423:77-86.

277. ALZET® Osmotic Pumps, How Does it Work? 2021 [Available from: https://www.alzet.com/products/alzet_pumps/how-does-it-work/].

278. ALZET® Osmotic Pumps, ALZET Brain Infusion Kits 2021 [Available from: <https://www.alzet.com/brain-infusion-kit/alzet-brain-infusion-kits/>].

279. Villagómez VM. Elaboración de esquemas anatómicos de las extremidades inferiores de la rata mediante una técnica de dibujo a lápiz.: Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.

280. Matsumoto A, Okada Y, Nakamichi M, Nakamura M, Toyama Y, Sobue G, et al. Disease progression of human SOD1 (G93A) transgenic ALS model rats. *J Neurosci Res*. 2006;83(1):119-33.

281. Rivlin AS, Tator CH. Objective clinical assessment of motor function after experimental spinal cord injury in the rat. *Journal of Neurosurgery*. 1977;47(4):577-81.

282. Luis de Medinaceli WJF, Richard Jed Wyatt. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Experimental Neurology*. 1982;77(3):634-43.

283. Migliarini S, Scaricamazza S, Valle C, Ferri A, Pasqualetti M, Ferraro E. Microglia Morphological Changes in the Motor Cortex of hSOD1(G93A) Transgenic ALS Mice. *Brain Sci*. 2021;11(6).

284. Sholl DA. Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J Anat*. 1953;87(4):387-406.

285. Sarikcioglu L, Demirel BM, Utuk A. Walking track analysis: an assessment method for functional recovery after sciatic nerve injury in the rat. *Folia Morphol (Warsz)*. 2009;68(1):1-7.

286. Yanez M, Matias-Guiu J, Arranz-Tagarro JA, Galan L, Vina D, Gomez-Pinedo U, et al. The neuroprotection exerted by memantine, minocycline and lithium, against neurotoxicity of CSF from patients with amyotrophic lateral sclerosis, is antagonized by riluzole. *Neurodegener Dis*. 2014;13(2-3):171-9.

287. Couratier P, Sindou P, Hugon J, Couratier P, Hugon J, Vallat JM, et al. Cell culture evidence for neuronal degeneration in amyotrophic lateral sclerosis being linked to glutamate AMPA/kainate receptors. *The Lancet*. 1993;341(8840):265-8.
288. Shruthi S, Sumitha R, Varghese AM, Ashok S, Chandrasekhar Sagar BK, Sathyaprabha TN, et al. Brain-Derived Neurotrophic Factor Facilitates Functional Recovery from ALS-Cerebral Spinal Fluid-Induced Neurodegenerative Changes in the NSC-34 Motor Neuron Cell Line. *Neurodegenerative Diseases*. 2017;17(1):44-58.
289. Shantanu S, Vijayalakshmi K, Shruthi S, Sagar BKC, Sathyaprabha TN, Nalini A, et al. VEGF alleviates ALS-CSF induced cytoplasmic accumulations of TDP-43 and FUS/TLS in NSC-34 cells. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 2017;81:48-52.
290. Kulshreshtha D, Vijayalakshmi K, Alladi PA, Sathyaprabha TN, Nalini A, Raju TR. Vascular Endothelial Growth Factor Attenuates Neurodegenerative Changes in the NSC-34 Motor Neuron Cell Line Induced by Cerebrospinal Fluid of Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis Patients. *Neurodegenerative Diseases*. 2011;8(5):322-30.
291. Vijayalakshmi K, Ostwal P, Sumitha R, Shruthi S, Varghese AM, Mishra P, et al. Role of VEGF and VEGFR2 Receptor in Reversal of ALS-CSF Induced Degeneration of NSC-34 Motor Neuron Cell Line. *Molecular Neurobiology*. 2015;51(3):995-1007.
292. Vijayalakshmi K, Alladi PA, Sathyaprabha TN, Subramaniam JR, Nalini A, Raju TR. Cerebrospinal Fluid from sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis patients induces degeneration of a cultured motor neuron cell line. *Brain Research*. 2009;1263:122-33.
293. Sharma A, Varghese AM, Vijayalakshmi K, Sumitha R, Prasanna VK, Shruthi S, et al. Cerebrospinal Fluid from Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis Patients Induces Mitochondrial and Lysosomal Dysfunction. *Neurochemical Research*. 2016;41(5):965-84.
294. Shobha K, Alladi PA, Nalini A, Sathyaprabha TN, Raju TR. Exposure to CSF from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients induces morphological transformation of astroglia and enhances GFAP and S100 β expression. *Neuroscience Letters*. 2010;473(1):56-61.
295. Gomez-Pinedo U, Yanez M, Matias-Guiu J, Galan L, Guerrero-Sola A, Benito-Martin MS, et al. Cellular changes in motor neuron cell culture produced by cytotoxic cerebrospinal fluid from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurologia*. 2014;29(6):346-52.
296. Mishra P-S, Vijayalakshmi K, Nalini A, Sathyaprabha TN, Kramer BW, Alladi PA, et al. Etiogenic factors present in the cerebrospinal fluid from amyotrophic lateral sclerosis patients induce predominantly pro-inflammatory responses in microglia. *Journal of Neuroinflammation*. 2017;14(1):251.
297. Mishra PS, Dhull DK, Nalini A, Vijayalakshmi K, Sathyaprabha TN, Alladi PA, et al. Astroglia acquires a toxic neuroinflammatory role in response to the cerebrospinal fluid from amyotrophic lateral sclerosis patients. *J Neuroinflammation*. 2016;13(1):212.

298. Shobha K, Vijayalakshmi K, Alladi PA, Nalini A, Sathyaprabha TN, Raju TR. Altered *in-vitro* and *in-vivo* expression of glial glutamate transporter-1 following exposure to cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Journal of the Neurological Sciences*. 2007;254(1):9-16.
299. Shahani N, Gourie-Devi M, Nalini A, Raju TR. Cyclophosphamide attenuates the degenerative changes induced by CSF from patients with amyotrophic lateral sclerosis in the neonatal rat spinal cord. *Journal of the Neurological Sciences*. 2001;185(2):109-18.
300. Shahani N, Gourie-Devi M, Nalini A, Rammohan PY, Shobha K, Harsha HN, et al. (-)-Deprenyl alleviates the degenerative changes induced in the neonatal rat spinal cord by CSF from amyotrophic lateral sclerosis patients. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Motor Neuron Disorders*. 2004;5(3):172-9.
301. Deepa P, Shahani N, Alladi PA, Vijayalakshmi K, Sathyaprabha TN, Nalini A, et al. Down regulation of trophic factors in neonatal rat spinal cord after administration of cerebrospinal fluid from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Journal of Neural Transmission*. 2011;118(4):531-8.
302. Ramamohan PY, Gourie-Devi M, Nalini A, Shobha K, Ramamohan Y, Joshi P, et al. Cerebrospinal fluid from amyotrophic lateral sclerosis patients causes fragmentation of the Golgi apparatus in the neonatal rat spinal cord. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*. 2007;8(2):79-82.
303. Rao MS, Devi GM, Nalini A, Shahani N, Raju TR. Neurofilament Phosphorylation is Increased in Ventral Horn Neurons of Neonatal Rat Spinal Cord Exposed to Cerebrospinal Fluid from patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurodegeneration*. 1995;4(4):397-401.
304. Sumitha R, Sidhu RJS, Sathyaprabha TN, Nalini A, Raju TR, Alladi PA. Differential expression of microRNA-206 in the gastrocnemius and biceps brachii in response to CSF from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Journal of the Neurological Sciences*. 2014;345(1):254-6.
305. Scott LL, Downing TG. β -N-Methylamino-L-alanine (BMAA) Toxicity Is Gender and Exposure-Age Dependent in Rats. *Toxins*. 2018;10(1):16.
306. Moreno-Jiménez L, Benito-Martín MS, Sanclemente-Alamán I, Matías-Guiu JA, Sancho-Bielsa F, Canales-Aguirre A, et al. Modelos experimentales murinos en la esclerosis lateral amiotrófica. *Puesta al día. Neurología*. 2021.
307. Deczkowska A, Keren-Shaul H, Weiner A, Colonna M, Schwartz M, Amit I. Disease-Associated Microglia: A Universal Immune Sensor of Neurodegeneration. *Cell*. 2018;173(5):1073-81.
308. Christoforidou E, Joilin G, Hafezparast M. Potential of activated microglia as a source of dysregulated extracellular microRNAs contributing to neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroinflammation*. 2020;17(1):135.

309. Clarke BE, Patani R. The microglial component of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*. 2020;143(12):3526-39.
310. Tam OH, Rozhkov NV, Shaw R, Kim D, Hubbard I, Fennessey S, et al. Postmortem Cortex Samples Identify Distinct Molecular Subtypes of ALS: Retrotransposon Activation, Oxidative Stress, and Activated Glia. *Cell Rep*. 2019;29(5):1164-77 e5.
311. D'Erchia AM, Gallo A, Manzari C, Raho S, Horner DS, Chiara M, et al. Massive transcriptome sequencing of human spinal cord tissues provides new insights into motor neuron degeneration in ALS. *Sci Rep*. 2017;7(1):10046.
312. Dols-Icardo O, Montal V, Sirisi S, Lopez-Pernas G, Cervera-Carles L, Querol-Vilaseca M, et al. Motor cortex transcriptome reveals microglial key events in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2020;7(5).
313. Holmoy T. T cells in amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurol*. 2008;15(4):360-6.
314. Jara JH, Gautam M, Kocak N, Xie EF, Mao Q, Bigio EH, et al. MCP1-CCR2 and neuroinflammation in the ALS motor cortex with TDP-43 pathology. *J Neuroinflammation*. 2019;16(1):196.
315. Mishra PS, Vijayalakshmi K, Nalini A, Sathyaprabha TN, Kramer BW, Alladi PA, et al. Etiogenic factors present in the cerebrospinal fluid from amyotrophic lateral sclerosis patients induce predominantly pro-inflammatory responses in microglia. *J Neuroinflammation*. 2017;14(1):251.
316. Chiò A, Pagani M, Agosta F, Calvo A, Cistaro A, Filippi M. Neuroimaging in amyotrophic lateral sclerosis: insights into structural and functional changes. *The Lancet Neurology*. 2014;13(12):1228-40.
317. Lloyd CM, Richardson MP, Brooks DJ, Al-Chalabi A, Leigh PN. Extramotor involvement in ALS: PET studies with the GABA_A ligand [¹¹C]flumazenil. *Brain*. 2000;123(11):2289-96.
318. Brettschneider J, Toledo JB, Van Deerlin VM, Elman L, McCluskey L, Lee VM, et al. Microglial activation correlates with disease progression and upper motor neuron clinical symptoms in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One*. 2012;7(6):e39216.
319. Puentes F, Malaspina A, van Noort JM, Amor S. Non-neuronal Cells in ALS: Role of Glial, Immune cells and Blood-CNS Barriers. *Brain Pathol*. 2016;26(2):248-57.
320. Mora JS, Genge A, Chio A, Estol CJ, Chaverri D, Hernandez M, et al. Masitinib as an add-on therapy to riluzole in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomized clinical trial. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 2020;21(1-2):5-14.
321. Brownell AL, Kuruppu D, Kil KE, Jokivarsi K, Poutiainen P, Zhu A, et al. PET imaging studies show enhanced expression of mGluR5 and inflammatory response during progressive degeneration in ALS mouse model expressing SOD1-G93A gene. *J Neuroinflammation*. 2015;12:217.

322. Boillee S, Vande Velde C, Cleveland DW. ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron*. 2006;52(1):39-59.
323. Philips T, Rothstein JD. Glial cells in amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol*. 2014;262 Pt B:111-20.
324. Liao B, Zhao W, Beers DR, Henkel JS, Appel SH. Transformation from a neuroprotective to a neurotoxic microglial phenotype in a mouse model of ALS. *Exp Neurol*. 2012;237(1):147-52.
325. Molnar-Kasza A, Hinteregger B, Neddens J, Rabl R, Flunkert S, Hutter-Paier B. Evaluation of Neuropathological Features in the SOD1-G93A Low Copy Number Transgenic Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front Mol Neurosci*. 2021;14:681868.
326. Alexianu ME, Kozovska M, Appel SH. Immune reactivity in a mouse model of familial ALS correlates with disease progression. *Neurology*. 2001;57(7):1282.
327. Vaz AR, Vizinha D, Morais H, Colaço AR, Loch-Neckel G, Barbosa M, et al. Overexpression of miR-124 in Motor Neurons Plays a Key Role in ALS Pathological Processes. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(11):6128.
328. Philips T, Rothstein JD. Rodent models of amyotrophic lateral sclerosis. *Current Protocols in Pharmacology*. 2015;2015:5.67.1--5.21.
329. Leichsenring A, Linnartz B, Zhu XR, Lubbert H, Stichel CC. Ascending neuropathology in the CNS of a mutant SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res*. 2006;1096(1):180-95.
330. Lewis KE, Rasmussen AL, Bennett W, King A, West AK, Chung RS, et al. Microglia and motor neurons during disease progression in the SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: changes in arginase1 and inducible nitric oxide synthase. *Journal of Neuroinflammation*. 2014;11(1):55.
331. Fendrick SE, Xue QS, Streit WJ. Formation of multinucleated giant cells and microglial degeneration in rats expressing a mutant Cu/Zn superoxide dismutase gene. *J Neuroinflammation*. 2007;4:9.
332. Weydt P, Möller T. Neuroinflammation in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *NeuroReport*. 2005;16(6):527-31.
333. Hensley K, Abdel-Moaty H, Hunter J, Mhatre M, Mou S, Nguyen K, et al. Primary glia expressing the G93A-SOD1 mutation present a neuroinflammatory phenotype and provide a cellular system for studies of glial inflammation. *J Neuroinflammation*. 2006;3:2.
334. Lall D, Lorenzini I, Mota TA, Bell S, Mahan TE, Ulrich JD, et al. C9orf72 deficiency promotes microglial-mediated synaptic loss in aging and amyloid accumulation. *Neuron*. 2021;109(14):2275-91 e8.

335. O'Rourke JG, Bogdanik L, Yanez A, Lall D, Wolf AJ, Muhammad AK, et al. C9orf72 is required for proper macrophage and microglial function in mice. *Science*. 2016;351(6279):1324-9.
336. Li K, Li J, Zheng J, Qin S. Reactive Astrocytes in Neurodegenerative Diseases. *Aging and disease*. 2019;10(3):664-75.
337. Crespo-Castrillo A, Arevalo MA. Microglial and Astrocytic Function in Physiological and Pathological Conditions: Estrogenic Modulation. *Int J Mol Sci*. 2020;21(9).
338. Schiffer D, Fiano V. Astroglialosis in ALS: possible interpretations according to pathogenetic hypotheses. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*. 2004;5(1):22-5.
339. Schiffer D, Cordera S, Cavalla P, Migheli A. Reactive astroglialosis of the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*. 1996;139:27-33.
340. Murayama S, Inoue K, Kawakami H, Bouldin TW, Suzuki K. A unique pattern of astrocytosis in the primary motor area in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol*. 1991;82(6):456-61.
341. Hanstock C, Sun K, Choi C, Eurich D, Camicioli R, Johnston W, et al. Spectroscopic markers of neurodegeneration in the mesial prefrontal cortex predict survival in ALS. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*. 2020;21(3-4):246-51.
342. Weerasekera A, Peeters R, Sima D, Dresselaers T, Sunaert S, De Vocht J, et al. Motor cortex metabolite alterations in amyotrophic lateral sclerosis assessed in vivo using edited and non-edited magnetic resonance spectroscopy. *Brain Research*. 2019;1718:22-31.
343. Kalra S. Magnetic Resonance Spectroscopy in ALS. *Front Neurol*. 2019;10:482.
344. Ta D, Ishaque A, Srivastava O, Hanstock C, Seres P, Eurich DT, et al. Progressive Neurochemical Abnormalities in Cognitive and Motor Subgroups of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurology*. 2021;97(8):e803.
345. Usman U, Choi C, Camicioli R, Seres P, Lynch M, Sekhon R, et al. Mesial Prefrontal Cortex Degeneration in Amyotrophic Lateral Sclerosis: A High-Field Proton MR Spectroscopy Study. *American Journal of Neuroradiology*. 2011;32(9):1677.
346. Srivastava O, Hanstock C, Chenji S, Mah D, Eurich D, Ta D, et al. Cerebral degeneration in amyotrophic lateral sclerosis: A prospective multicenter magnetic resonance spectroscopy study. *Neurol Clin Pract*. 2019;9(5):400-7.
347. Higashihara M, Ishibashi K, Tokumaru AM, Iwata A, Ishii K. 18F-THK5351 PET Can Identify Core Lesions in Different Amyotrophic Lateral Sclerosis Phenotypes. *Clin Nucl Med*. 2021;46(12):e582-e3.

348. Alshikho MJ, Zürcher NR, Loggia ML, Cernasov P, Chonde DB, Izquierdo Garcia D, et al. Glial activation colocalizes with structural abnormalities in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*. 2016;87(24):2554.
349. Ilieva H, Polymenidou M, Cleveland DW. Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *Journal of Cell Biology*. 2009;187(6):761-72.
350. Tan H, Chen M, Pang D, Xia X, Du C, Yang W, et al. LanCL1 promotes motor neuron survival and extends the lifespan of amyotrophic lateral sclerosis mice. *Cell Death Differ*. 2020;27(4):1369-82.
351. Yang WW, Sidman RL, Taksir TV, Treleaven CM, Fidler JA, Cheng SH, et al. Relationship between neuropathology and disease progression in the SOD1G93A ALS mouse. *Experimental Neurology*. 2011;227(2):287-95.
352. Bruijn LI, Becher MW, Lee MK, Anderson KL, Jenkins NA, Copeland NG, et al. ALS-Linked SOD1 Mutant G85R Mediates Damage to Astrocytes and Promotes Rapidly Progressive Disease with SOD1-Containing Inclusions. *Neuron*. 1997;18(2):327-38.
353. Ramirez-Jarquín UN, Rojas F, van Zundert B, Tapia R. Chronic infusion of SOD1(G93A) astrocyte-secreted factors induces spinal motoneuron degeneration and neuromuscular dysfunction in healthy rats. *J Cell Physiol*. 2017;232(10):2610-5.
354. Barton SK, Lau CL, Chiam MDF, Tomas D, Muyderman H, Beart PM, et al. Mutant TDP-43 Expression Triggers TDP-43 Pathology and Cell Autonomous Effects on Primary Astrocytes: Implications for Non-cell Autonomous Pathology in ALS. *Neurochemical Research*. 2020;45(6):1451-9.
355. Walker AK, Tripathy K, Restrepo CR, Ge G, Xu Y, Kwong LK, et al. An insoluble frontotemporal lobar degeneration-associated TDP-43 C-terminal fragment causes neurodegeneration and hippocampus pathology in transgenic mice. *Human Molecular Genetics*. 2015;24(25):7241-54.
356. Tsai K-J, Yang C-H, Fang Y-H, Cho K-H, Chien W-L, Wang W-T, et al. Elevated expression of TDP-43 in the forebrain of mice is sufficient to cause neurological and pathological phenotypes mimicking FTL-D. *Journal of Experimental Medicine*. 2010;207(8):1661-73.
357. Xu Y-F, Zhang Y-J, Lin W-L, Cao X, Stetler C, Dickson DW, et al. Expression of mutant TDP-43 induces neuronal dysfunction in transgenic mice. *Molecular Neurodegeneration*. 2011;6(1):73.
358. Shan X, Chiang P-M, Price DL, Wong PC. Altered distributions of Gemini of coiled bodies and mitochondria in motor neurons of TDP-43 transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(37):16325.
359. Tong J, Huang C, Bi F, Wu Q, Huang B, Liu X, et al. Expression of ALS-linked TDP-43 mutant in astrocytes causes non-cell-autonomous motor neuron death in rats. *The EMBO Journal*. 2013;32(13):1917-26.

360. Stallings NR, Puttaparthi K, Luther CM, Burns DK, Elliott JL. Progressive motor weakness in transgenic mice expressing human TDP-43. *Neurobiology of Disease*. 2010;40(2):404-14.
361. Dahlke C, Saberi D, Ott B, Brand-Saberi B, Schmitt-John T, Theiss C. Inflammation and neuronal death in the motor cortex of the wobbler mouse, an ALS animal model. *J Neuroinflammation*. 2015;12:215.
362. Blondet B, Hantaz-Ambroise D, Aït-Ikhlef A, Cambier D, Murawsky M, Rieger F. Astrocytosis in wobbler mouse spinal cord involves a population of astrocytes which is glutamine synthetase-negative. *Neuroscience Letters*. 1995;183(3):179-82.
363. Mitchell JC, McGoldrick P, Vance C, Hortobagyi T, Sreedharan J, Rogelj B, et al. Overexpression of human wild-type FUS causes progressive motor neuron degeneration in an age- and dose-dependent fashion. *Acta Neuropathologica*. 2013;125(2):273-88.
364. Qiu H, Lee S, Shang Y, Wang W-Y, Au KF, Kamiya S, et al. ALS-associated mutation FUS-R521C causes DNA damage and RNA splicing defects. *The Journal of Clinical Investigation*. 2014;124(3):981-99.
365. Tian KW, Jiang H, Wang BB, Zhang F, Han S. Intravenous injection of l-BMAA induces a rat model with comprehensive characteristics of amyotrophic lateral sclerosis/Parkinson-dementia complex. *Toxicol Res (Camb)*. 2016;5(1):79-96.
366. Yin HZ, Yu S, Hsu CI, Liu J, Acab A, Wu R, et al. Intrathecal infusion of BMAA induces selective motor neuron damage and astrogliosis in the ventral horn of the spinal cord. *Exp Neurol*. 2014;261:1-9.
367. Davis DA, Cox PA, Banack SA, Lecusay PD, Garamszegi SP, Hagan MJ, et al. l-Serine Reduces Spinal Cord Pathology in a Vervet Model of Preclinical ALS/MND. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2020;79(4):393-406.
368. Cruz-Aguado R, Winkler D, Shaw CA. Lack of behavioral and neuropathological effects of dietary beta-methylamino-L-alanine (BMAA) in mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 2006;84(2):294-9.
369. Anzilotti S, Brancaccio P, Simeone G, Valsecchi V, Vinciguerra A, Secondo A, et al. Preconditioning, induced by sub-toxic dose of the neurotoxin l-BMAA, delays ALS progression in mice and prevents Na(+)/Ca(2+) exchanger 3 downregulation. *Cell Death Dis*. 2018;9(2):206.
370. MacLean M, Juranek J, Cuddapah S, Lopez-Diez R, Ruiz HH, Hu J, et al. Microglia RAGE exacerbates the progression of neurodegeneration within the SOD1(G93A) murine model of amyotrophic lateral sclerosis in a sex-dependent manner. *J Neuroinflammation*. 2021;18(1):139.
371. Sánchez CV. Diseño y evaluación de un modelo experimental para esclerosis lateral amiotrófica esporádica mediante el efecto citotóxico del líquido cefalorraquídeo: Universidad Complutense de Madrid; 2013.

372. Guttenplan KA, Weigel MK, Adler DI, Couthouis J, Liddelw SA, Gitler AD, et al. Knockout of reactive astrocyte activating factors slows disease progression in an ALS mouse model. *Nat Commun.* 2020;11(1):3753.
373. Liddelw SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature.* 2017;541(7638):481-7.
374. Tada S, Okuno T, Hitoshi Y, Yasui T, Honorat JA, Takata K, et al. Partial suppression of M1 microglia by Janus kinase 2 inhibitor does not protect against neurodegeneration in animal models of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroinflammation.* 2014;11(1):179.
375. Graber DJ, Hickey WF, Harris BT. Progressive changes in microglia and macrophages in spinal cord and peripheral nerve in the transgenic rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroinflammation.* 2010;7(1):8.
376. Kazama M, Kato Y, Kakita A, Noguchi N, Urano Y, Masui K, et al. Astrocytes release glutamate via cystine/glutamate antiporter upregulated in response to increased oxidative stress related to sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathology.* 2020;40(6):587-98.
377. Takeda T, Kitagawa K, Arai K. Phenotypic variability and its pathological basis in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathology.* 2020;40(1):40-56.
378. Grad LI, Rouleau GA, Ravits J, Cashman NR. Clinical Spectrum of Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine.* 2017;7(8).
379. Tanikawa S, Tanino M, Wang L, Ishikawa M, Miyazaki M, Tsuda M, et al. Autopsy findings in the early stage of amyotrophic lateral sclerosis with “dropped head” syndrome. *Neuropathology.* 2019;39(5):374-7.
380. Kon T, Mori F, Oyama Y, Tanji K, Kimura T, Takahashi S, et al. An autopsy case of early-stage amyotrophic lateral sclerosis with TDP-43 immunoreactive neuronal, but not glial, inclusions. *Neuropathology.* 2019;39(3):224-30.
381. Hideshima M, Beck G, Yamadera M, Motoyama Y, Ikenaka K, Kakuda K, et al. A clinicopathological study of ALS with L126S mutation in the SOD1 gene presenting with isolated inferior olivary hypertrophy. *Neuropathology.* 2020;40(2):191-5.
382. Matsubara T, Izumi Y, Oda M, Takahashi M, Maruyama H, Miyamoto R, et al. An autopsy report of a familial amyotrophic lateral sclerosis case carrying VCP Arg487His mutation with a unique TDP-43 proteinopathy. *Neuropathology.* 2021;41(2):118-26.
383. Mitani TT, Beck G, Kido K, Yamashita R, Yonenobu Y, Ogawa T, et al. Amyotrophic lateral sclerosis with speech apraxia, predominant upper motor neuron signs, and prominent iron accumulation in the frontal operculum and precentral gyrus. *Neuropathology.* 2021;41(4):324-31.

384. Weinreich M, Shepherd SR, Verber N, Wyles M, Heath PR, Highley JR, et al. Neuropathological characterization of a novel TANK binding kinase (TBK1) gene loss of function mutation associated with amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 2020;46(3):279-91.
385. Ciervo Y, Gatto N, Allen C, Grierson A, Ferraiuolo L, Mead RJ, et al. Adipose-derived stem cells protect motor neurons and reduce glial activation in both *in vitro* and *in vivo* models of ALS. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*. 2021;21:413-33.
386. Gento-Caro Á, Vilches-Herrando E, Portillo F, González-Forero D, Moreno-López B. Targeting autotaxin impacts disease advance in the SOD1-G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Pathology*. n/a(n/a):e13022.
387. Casas C, Herrando-Grabulosa M, Manzano R, Mancuso R, Osta R, Navarro X. Early presymptomatic cholinergic dysfunction in a murine model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Behav*. 2013;3(2):145-58.
388. Sonobe Y, Aburas J, Krishnan G, Fleming AC, Ghadge G, Islam P, et al. A *C. elegans* model of C9orf72-associated ALS/FTD uncovers a conserved role for eIF2D in RAN translation. *Nature Communications*. 2021;12(1):6025.
389. Fortier G, Butti Z, Patten SA. Modelling C9orf72-Related Amyotrophic Lateral Sclerosis in Zebrafish. *Biomedicines*. 2020;8(10).
390. Nguyen L, Montrasio F, Pattamatta A, Tusi SK, Bardhi O, Meyer KD, et al. Antibody Therapy Targeting RAN Proteins Rescues C9 ALS/FTD Phenotypes in *C9orf72* Mouse Model. *Neuron*. 2020;105(4):645-62.e11.
391. Dong W, Zhang L, Sun C, Gao X, Guan F, Li J, et al. Knock in of a hexanucleotide repeat expansion in the C9orf72 gene induces ALS in rats. *Animal Models and Experimental Medicine*. 2020;3(3):237-44.
392. Maor-Nof M, Shipony Z, Lopez-Gonzalez R, Nakayama L, Zhang Y-J, Couthouis J, et al. p53 is a central regulator driving neurodegeneration caused by *C9orf72* poly(PR). *Cell*. 2021;184(3):689-708.e20.
393. Azoulay-Ginsburg S, Di Salvio M, Weitman M, Afri M, Ribeiro S, Ebbinghaus S, et al. Chemical chaperones targeted to the endoplasmic reticulum (ER) and lysosome prevented neurodegeneration in a C9orf72 repeat expansion drosophila amyotrophic lateral sclerosis (ALS) model. *Pharmacological Reports*. 2021;73(2):536-50.
394. Nguyen L, Laboissonniere LA, Guo S, Pilotto F, Scheidegger O, Oestmann A, et al. Survival and Motor Phenotypes in FVB C9-500 ALS/FTD BAC Transgenic Mice Reproduced by Multiple Labs. *Neuron*. 2020;108(4):784-96.e3.

395. Wen X, An P, Li H, Zhou Z, Sun Y, Wang J, et al. Tau Accumulation via Reduced Autophagy Mediates GGGGCC Repeat Expansion-Induced Neurodegeneration in Drosophila Model of ALS. *Neuroscience Bulletin*. 2020;36(12):1414-28.
396. Schludi MH, Becker L, Garrett L, Gendron TF, Zhou Q, Schreiber F, et al. Spinal poly-GA inclusions in a C9orf72 mouse model trigger motor deficits and inflammation without neuron loss. *Acta Neuropathologica*. 2017;134(2):241-54.
397. Mordes DA, Morrison BM, Ament XH, Cantrell C, Mok J, Eggan P, et al. Absence of Survival and Motor Deficits in 500 Repeat *C9ORF72* BAC Mice. *Neuron*. 2020;108(4):775-83.e4.
398. Ding X, Xiang Z, Qin C, Chen Y, Tian H, Meng L, et al. Spreading of TDP-43 pathology via pyramidal tract induces ALS-like phenotypes in TDP-43 transgenic mice. *Acta Neuropathol Commun*. 2021;9(1):15.
399. Wegorzewska I, Baloh RH. TDP-43-based animal models of neurodegeneration: new insights into ALS pathology and pathophysiology. *Neurodegener Dis*. 2011;8(4):262-74.
400. Wood A, Gurfinkel Y, Polain N, Lamont W, Lyn Rea S. Molecular Mechanisms Underlying TDP-43 Pathology in Cellular and Animal Models of ALS and FTL. *Int J Mol Sci*. 2021;22(9).
401. Wright AL, Della Gatta PA, Le S, Berning BA, Mehta P, Jacobs KR, et al. Riluzole does not ameliorate disease caused by cytoplasmic TDP-43 in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *European Journal of Neuroscience*. 2021;54(6):6237-55.
402. Zhou H, Huang C, Chen H, Wang D, Landel CP, Xia PY, et al. Transgenic Rat Model of Neurodegeneration Caused by Mutation in the TDP Gene. *PLOS Genetics*. 2010;6(3):e1000887.
403. Birsa N, Ule AM, Garone MG, Tsang B, Mattedi F, Chong PA, et al. FUS-ALS mutants alter FMRP phase separation equilibrium and impair protein translation. *Science Advances*. 2021;7(30):eabf8660.
404. Labarre A, Tossing G, Maios C, Doyle JJ, Parker JA. A single copy transgenic mutant FUS strain reproduces age-dependent ALS phenotypes in *C. elegans*. *MicroPubl Biol*. 2021;2021:10.17912/micropub.biology.000473.
405. Sahadevan S, Hembach KM, Tantardini E, Pérez-Berlanga M, Hruska-Plochan M, Megat S, et al. Synaptic FUS accumulation triggers early misregulation of synaptic RNAs in a mouse model of ALS. *Nature Communications*. 2021;12(1):3027.
406. Karamyan VT, Speth RC. Animal models of BMAA neurotoxicity: a critical review. *Life Sci*. 2008;82(5-6):233-46.
407. Scott LL, Downing TG. A Single Neonatal Exposure to BMAA in a Rat Model Produces Neuropathology Consistent with Neurodegenerative Diseases. *Toxins (Basel)*. 2017;10(1).

408. Okle O, Rath L, Galizia CG, Dietrich DR. The cyanobacterial neurotoxin beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) induces neuronal and behavioral changes in honeybees. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013;270(1):9-15.
409. Banack SA, Cox PA. Creating a Simian Model of Guam ALS/PDC Which Reflects Chamorro Lifetime BMAA Exposures. *Neurotox Res.* 2018;33(1):24-32.
410. Ramroop H, Cruz R. *Electrodiagnostic Evaluation Of Motor Neuron Disease.* StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
- Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.; 2021.
411. Larson ST, Wilbur J. Muscle Weakness in Adults: Evaluation and Differential Diagnosis. *Am Fam Physician.* 2020;101(2):95-108.
412. Mayer RF, Mawdsley C. Studies in man and cat of the significance of the H wave. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry.* 1965;28(3):201.
413. Gozariu M, Roth V, Keime F, Le Bars D, Willer J-C. An electrophysiological investigation into the monosynaptic H-reflex in the rat. *Brain Research.* 1998;782(1):343-7.
414. Zoccollella S, Mastronardi A, Scarafino A, Iliceto G, D'Errico E, Fraddosio A, et al. Motor-evoked potentials in amyotrophic lateral sclerosis: potential implications in detecting subclinical UMN involvement in lower motor neuron phenotype. *J Neurol.* 2020;267(12):3689-95.
415. Vacchiano V, Di Stasi V, Rizzo G, Giannoccaro MP, Donadio V, Bartolomei I, et al. Prognostic value of EMG genioglossus involvement in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Neurophysiol.* 2021;132(10):2416-21.
416. Fileccia E, De Pasqua S, Rizzo G, Di Stasi V, Vacchiano V, Avoni P, et al. Denervation findings on EMG in amyotrophic lateral sclerosis and correlation with prognostic milestones: Data from a retrospective study. *Clinical Neurophysiology.* 2020;131(8):2017-22.
417. Sato Y, Nakatani E, Watanabe Y, Fukushima M, Nakashima K, Kannagi M, et al. Prediction of prognosis of ALS: Importance of active denervation findings of the cervical-upper limb area and trunk area. *Intractable Rare Dis Res.* 2015;4(4):181-9.
418. Shimizu T, Fujimaki Y, Nakatani-Enomoto S, Matsubara S, Watabe K, Rossini PM, et al. Complex fasciculation potentials and survival in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Neurophysiol.* 2014;125(5):1059-64.
419. Kanai K, Shibuya K, Sato Y, Misawa S, Nasu S, Sekiguchi Y, et al. Motor axonal excitability properties are strong predictors for survival in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2012;83(7):734-8.
420. Lee JD, Heshmat S, Heggie S, Thorpe KA, McCombe PA, Henderson RD. Clinical and electrophysiological examination of pinch strength in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve.* 2021;63(1):108-13.

421. Fogarty MJ. Neuronal Hypoexcitability and Dendritic Overbranching - The Case for Failed Compensatory Mechanisms in ALS Aetiology. *Neuroscience*. 2021;465:231-2.
422. Pradhan J, Bellingham MC. Neurophysiological Mechanisms Underlying Cortical Hyper-Excitability in Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Review. *Brain Sci*. 2021;11(5).
423. Marchand-Pauvert V, Peyre I, Lackmy-Vallee A, Querin G, Bede P, Lacomblez L, et al. Absence of hyperexcitability of spinal motoneurons in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Physiol*. 2019;597(22):5445-67.
424. Tekgül H, Polat M, Tosun A, Serdaroğlu G, Gökben S. Electrophysiologic assessment of spasticity in children using H-reflex. *Turk J Pediatr*. 2013;55(5):519-23.
425. Liao SJ, Huang Z, Lai CY, Chen JY, Xiao PY, Cai Q, et al. The rostral to caudal gradient of clinical and electrophysiological features in sporadic amyotrophic lateral sclerosis with bulbar-onset. *J Int Med Res*. 2020;48(9):300060520956502.
426. Mancuso R, Santos-Nogueira E, Osta R, Navarro X. Electrophysiological analysis of a murine model of motoneuron disease. *Clin Neurophysiol*. 2011;122(8):1660-70.
427. Petrosyan H, Liang L, Tesfa A, Sisto SA, Fahmy M, Arvanian VL. Modulation of H-reflex responses and frequency-dependent depression by repetitive spinal electromagnetic stimulation: From rats to humans and back to chronic spinal cord injured rats. *Eur J Neurosci*. 2020;52(12):4875-89.
428. Reese NB, Skinner RD, Mitchell D, Yates C, Barnes CN, Kiser TS, et al. Restoration of frequency-dependent depression of the H-reflex by passive exercise in spinal rats. *Spinal Cord*. 2006;44(1):28-34.
429. Hegedus J, Putman CT, Gordon T. Time course of preferential motor unit loss in the SOD1 G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis*. 2007;28(2):154-64.
430. Filipchuk A, Pambo-Pambo A, Gaudel F, Liabeuf S, Brocard C, Gueritaud JP, et al. Early Hypoexcitability in a Subgroup of Spinal Motoneurons in Superoxide Dismutase 1 Transgenic Mice, a Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neuroscience*. 2021;463:337-53.
431. Fogarty MJ, Noakes PG, Bellingham MC. Motor Cortex Layer V Pyramidal Neurons Exhibit Dendritic Regression, Spine Loss, and Increased Synaptic Excitation in the Presymptomatic hSOD1^{G93A} Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *The Journal of Neuroscience*. 2015;35(2):643.
432. Saba L, Viscomi MT, Caioli S, Pignataro A, Bisicchia E, Pieri M, et al. Altered Functionality, Morphology, and Vesicular Glutamate Transporter Expression of Cortical Motor Neurons from a Presymptomatic Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Cerebral Cortex*. 2015;26(4):1512-28.

433. Pieri M, Carunchio I, Curcio L, Mercuri NB, Zona C. Increased persistent sodium current determines cortical hyperexcitability in a genetic model of amyotrophic lateral sclerosis. *Experimental Neurology*. 2009;215(2):368-79.
434. Fogarty MJ, Klenowski PM, Lee JD, Driberg-Thompson JR, Bartlett SE, Ngo ST, et al. Cortical synaptic and dendritic spine abnormalities in a presymptomatic TDP-43 model of amyotrophic lateral sclerosis. *Scientific Reports*. 2016;6(1):37968.
435. Sankaranarayanan R, Raghavan M, Nalini A, Laxmi TR, Raju TR. Reach task-associated excitatory overdrive of motor cortical neurons following infusion with ALS-CSF. *Journal of Neural Transmission*. 2014;121(1):49-58.
436. Petit CS, Lee JJ, Boland S, Swarup S, Christiano R, Lai ZW, et al. Inhibition of sphingolipid synthesis improves outcomes and survival in GARP mutant wobbler mice, a model of motor neuron degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(19):10565-74.
437. Guerra S, Chung R, Yerbury J, Karl T. Behavioural effects of cage systems on the G93A Superoxide Dismutase 1 transgenic mouse model for amyotrophic lateral sclerosis. *Genes Brain Behav*. 2021;20(5):e12735.
438. Ye Q, Xia Y, Yao Z. Classification of Gait Patterns in Patients with Neurodegenerative Disease Using Adaptive Neuro-Fuzzy Inference System. *Comput Math Methods Med*. 2018;2018:9831252.
439. Burgess RW, Cox GA, Seburn KL. Neuromuscular Disease Models and Analysis. *Methods Mol Biol*. 2016;1438:349-94.
440. Dijkstra JR, Meek MF, Robinson PH, Gramsbergen A. Methods to evaluate functional nerve recovery in adult rats: walking track analysis, video analysis and the withdrawal reflex. *Journal of Neuroscience Methods*. 2000;96(2):89-96.
441. Rostosky CM, Milosevic I. Gait Analysis of Age-dependent Motor Impairments in Mice with Neurodegeneration. *J Vis Exp*. 2018(136).
442. Hampton TG, Amende I. Treadmill Gait Analysis Characterizes Gait Alterations in Parkinson's Disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis Mouse Models. *Journal of Motor Behavior*. 2009;42(1):1-4.
443. Guillot TS, Asress SA, Richardson JR, Glass JD, Miller GW. Treadmill Gait Analysis Does Not Detect Motor Deficits in Animal Models of Parkinson's Disease or Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Journal of Motor Behavior*. 2008;40(6):568-77.
444. Tang W, Tasch U, Neerchal NK, Zhu L, Yarowsky P. Measuring early pre-symptomatic changes in locomotion of SOD1-G93A rats--a rodent model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci Methods*. 2009;176(2):254-62.

445. Vergouts M, Marinangeli C, Ingelbrecht C, Genard G, Schakman O, Sternotte A, et al. Early ALS-type gait abnormalities in AMP-dependent protein kinase-deficient mice suggest a role for this metabolic sensor in early stages of the disease. *Metab Brain Dis.* 2015;30(6):1369-77.
446. Lewis KEA, Bennett W, Blizzard CL, West AK, Chung RS, Chuah MI. The influence of metallothionein treatment and treadmill running exercise on disease onset and survival in SOD1(G93A) amyotrophic lateral sclerosis mice. *Eur J Neurosci.* 2020;52(4):3223-41.
447. Evans TM, Jaramillo CA, Sataranatarajan K, Watts L, Sabia M, Qi W, et al. The effect of mild traumatic brain injury on peripheral nervous system pathology in wild-type mice and the G93A mutant mouse model of motor neuron disease. *Neuroscience.* 2015;298:410-23.
448. Knippenberg S, Thau N, Dengler R, Petri S. Significance of behavioural tests in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Behav Brain Res.* 2010;213(1):82-7.
449. Lepore AC, Tolmie C, O'Donnell J, Wright MC, Dejea C, Rauck B, et al. Peripheral hyperstimulation alters site of disease onset and course in SOD1 rats. *Neurobiol Dis.* 2010;39(3):252-64.
450. Filali M, Lalonde R, Rivest S. Sensorimotor and cognitive functions in a SOD1(G37R) transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Behav Brain Res.* 2011;225(1):215-21.
451. Mancuso R, Olivan S, Osta R, Navarro X. Evolution of gait abnormalities in SOD1(G93A) transgenic mice. *Brain Res.* 2011;1406:65-73.
452. van Hummel A, Chan G, van der Hoven J, Morsch M, Ippati S, Suh L, et al. Selective Spatiotemporal Vulnerability of Central Nervous System Neurons to Pathologic TAR DNA-Binding Protein 43 in Aged Transgenic Mice. *Am J Pathol.* 2018;188(6):1447-56.
453. Watkins JA, Alix JJP, Shaw PJ, Mead RJ. Extensive phenotypic characterisation of a human TDP-43Q331K transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Scientific Reports.* 2021;11(1):16659.
454. Jackson KL, Dayton RD, Fisher-Perkins JM, Didier PJ, Baker KC, Weimer M, et al. Initial gene vector dosing for studying symptomatology of amyotrophic lateral sclerosis in non-human primates. *J Med Primatol.* 2015;44(2):66-75.
455. Watkins J, Ghosh A, Keerie AFA, Alix JJP, Mead RJ, Sreedharan J. Female sex mitigates motor and behavioural phenotypes in TDP-43(Q331K) knock-in mice. *Sci Rep.* 2020;10(1):19220.
456. Buffenoir K, Decq P, Perot C. Time course of the soleus M response and H reflex after lidocaine tibial nerve block in the rat. *ScientificWorldJournal.* 2013;2013:912716.

ANEXOS



SERVICIO DE NEUROLOGÍA

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA REALIZACIÓN DE PUNCIÓN LUMBAR

D./Dña _____, como paciente (o representante del paciente D./Dña. _____), manifiesto que he sido informado/a por el Dr. _____ de los siguientes aspectos:

*** Procedimiento:**

La prueba que se le va a practicar consiste en una punción con un catéter (tubo fino) en el espacio subaracnoideo del canal raquídeo, donde se encuentra el líquido cefalorraquídeo, que recubre el sistema nervioso central. Dicha punción se realiza habitualmente entre las dos últimas vértebras lumbares, donde en condiciones normales ya ha acabado la médula espinal. A veces, por las características de la columna, es necesario efectuar la punción en otro lugar y, en ocasiones, hay que pinchar más de una vez. La prueba no requiere ayuno ni administración de sedantes y se puede realizar fácilmente en la cama del paciente.

Este procedimiento tiene por objeto obtener una pequeña cantidad de líquido cefalorraquídeo, para su posterior análisis en el laboratorio y así poder diagnosticar y/o tratar su enfermedad. Además, es posible que se almacene una pequeña cantidad de líquido para practicar estudios posteriores. Los resultados que se obtengan podrán ser empleados para diversos trabajos o publicaciones, pero siempre de modo anónimo y confidencial.

*** Alternativas:**

No hay otra prueba alternativa para conseguir esa información por lo que es fundamental para el diagnóstico y eventual tratamiento de su patología.

*** Riesgos:**

Es una técnica segura realizada por médicos especializados que tomarán las precauciones oportunas para evitar la aparición de complicaciones.

Lo más frecuente es el dolor local en el lugar de la punción y dolor de cabeza en las horas siguientes que, en caso de aparecer, se resuelve con reposo relativo e ingesta de líquidos.

Otras complicaciones, aunque muy infrecuentes, consisten en infección o hematoma en el lugar de la punción, hormigueos en las piernas o lesión inadvertida de raíces espinales o médula espinal.

En casos muy excepcionales, si existen procesos dentro del cráneo que aumenten su presión, puede producirse un desplazamiento de parte del cerebro o del cerebelo hacia el canal raquídeo que pudiera producir lesiones irreversibles o incluso el fallecimiento. En gran parte, este mínimo riesgo queda reducido con la valoración clínica del paciente o con la realización de pruebas de imagen.

Otros riesgos o complicaciones que pueden aparecer teniendo en cuenta sus circunstancias personales (estado de salud previo, edad, etc.) son: _____

Antes de firmar este consentimiento, si desea que le facilitemos más información o tiene cualquier duda, no tenga reparos en preguntarnos. Le atenderemos con mucho gusto.

DECLARO que todas mis dudas y preguntas han sido convenientemente aclaradas y que he comprendido toda la información que se me ha proporcionado sobre la prueba, para qué sirve, cómo se hace, los riesgos que tiene y las posibles alternativas. Por ello, libremente, doy mi **CONSENTIMIENTO** a los profesionales adecuados que se precisen, para que se me (le) realice la prueba descrita. Asimismo, doy mi **consentimiento** para que se almacene una pequeña cantidad de líquido para estudios posteriores.

PUEDO RETIRAR ESTE CONSENTIMIENTO CUANDO LO DESEE.

Observaciones del paciente: _____

Firma del paciente:
(familiar o representante,
en caso de incapacidad)

Firma del médico:
(médico que informa)

Fdo: _____
Fecha: _____

Fdo: _____
Fecha: _____



Versión feb02

Anexo 2
Citotoxicidad LCR
Modelo Agudo

ID muestra	Citotóxico/No citotóxico
1	Citotóxico
4	Citotóxico
13	Citotóxico
14	Citotóxico
17	Citotóxico
19	Citotóxico
HC120	Citotóxico
HC 130	Citotóxico
HC 137	Citotóxico
HC 138	Citotóxico
HC 141	Citotóxico
HC 143	Citotóxico
HC 149	Citotóxico
HC150	Citotóxico
HC 152	Citotóxico
HC 154	Citotóxico
HC 175	Citotóxico

Tabla 18: Muestras citotóxicas utilizadas en el Modelo Agudo.

ID muestra	Citotóxico/No citotóxico
HC 130	Citotóxico
HC 137	Citotóxico
HC 138	Citotóxico
HC 141	Citotóxico
HC 143	Citotóxico
HC 144	No Citotóxico
HC 148	No Citotóxico
HC 149	Citotóxico
HC 150	Citotóxico
HC 152	Citotóxico
HC 154	Citotóxico
HC 156	No Citotóxico
HC 157	No Citotóxico
HC 158	No Citotóxico
HC 175	Citotóxico

Tabla 19: Citotoxicidad de los LCR-ELA del Modelo Crónico. Se dividen las muestras entre LCR-Citotóxico y LCR-No Citotóxico.



Comunidad de Madrid



Vista la solicitud presentada por PABLO ANTONIO GONZÁLEZ LÓPEZ (ULISES GÓMEZ PINEDO), para la autorización del proyecto de memoria técnica titulada EFECTO DE LA INFUSIÓN CRÓNICA DE LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO (LCR) DE PACIENTES DE ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA (ELA) EN RATA, a desarrollar en el centro usuario HOSPITAL CLÍNICO SAN CARLOS con código de registro ES280790000088 y siendo el responsable del proyecto ULISES GÓMEZ PINEDO:

Visto el informe del Área de Protección Animal.

Considerando que el citado proyecto se ajusta a lo establecido en el Real Decreto 53/2013 de 1 de febrero por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

Esta Dirección General ha resuelto: autorizar la realización del proyecto referenciado siempre que se mantengan las condiciones que dieron lugar a la autorización y que el personal que intervenga tenga la preparación y formación adecuada que se especifica en el citado Real Decreto.

Tal y como se indica en el informe de evaluación del proyecto presentado, éste debe ser sometido a una evaluación retrospectiva en el momento que indica dicho informe.

Contra esta Resolución, que no agota la vía administrativa, cabe interponer recurso de alzada en el plazo de un mes, contado desde el día siguiente a la recepción de esta notificación, ante el Viceconsejero de Medio Ambiente, Administración Local y Ordenación del Territorio, conforme a lo establecido en el artículo 121 y siguientes de la Ley 39/2015, de 1 de octubre, del Procedimiento Administrativo Común de las Administraciones Públicas

Madrid, 21 de febrero de 2017.
EL DIRECTOR GENERAL DE AGRICULTURA Y GANADERÍA
P.D.F. Resolución 2 de noviembre de 2015
EL SUBDIRECTOR GENERAL DE RECURSOS AGRARIOS



Fdo.: Jesús Carpintero Hervás

Ref PROEX 005/17

Comité de Ética de Experimentación Animal

INFORME DEL COMITÉ DE ÉTICA DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

1º. El Comité de Ética de Experimentación Animal reunido en **Comisión Permanente** el día 12/12/2016, (Acta 12.1/2016) ha evaluado el proyecto indicado a continuación:

PROYECTO TIPO III: "Efecto de la infusión crónica de líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes de Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) en rata".

PROCEDIMIENTOS:

1. Administración de anestesia, por vía intraperitoneal.
2. Implante de mini-bombas osmóticas en el ventrículo lateral derecho de ratas Wistar .
3. Implante de mini-bombas osmóticas en el ventrículo lateral derecho de ratas Wistar con LCR de pacientes de enfermedades no neurodegenerativas ni infecciosas.
4. Implante de mini-bombas osmóticas en el ventrículo lateral derecho de ratas Wistar con LCR de pacientes con ELA.
5. Implante de mini-bombas osmóticas en el ventrículo lateral derecho de ratas Wistar con LCR de pacientes con ELA incluyendo además el tratamiento con riluzol.
6. Administración de analgésicos, antibióticos y anti-inflamatorios por vía subcutánea.
7. Estabulación individualizada de los animales o privación a corto plazo de compañeros sociales.
8. Test de Plano Inclinado.
9. Test de Matsumoto.
10. Electromiograma.
11. Perfusión Intracardíaca con paraformaldehído 4%.

Responsable del Proyecto:

Dr. Ulises Gómez Pinedo

Comité de Ética de Experimentación Animal

2º Tras la evaluación del citado proyecto de conformidad con el artículo 38 del Real Decreto 53/2013, y una vez presentada la documentación/información adicional requerida, este Comité, entendiendo que el proyecto ha sido diseñado teniendo en cuenta los requisitos de reemplazo, reducción y refinamiento referidos en el artículo 4 del citado Real Decreto, acuerda **INFORMAR FAVORABLEMENTE** la ejecución del mismo en el Hospital Clínico San Carlos.

3º El CEEA, de conformidad con el artículo 38.1. e) del Real Decreto, realizará el seguimiento del Proyecto con el fin de que se ejecute de acuerdo a la autorización de la Comunidad Autónoma de Madrid.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos donde proceda se expide el siguiente documento.

Lo que firmo en Madrid, a 12 de diciembre de 2016



Hospital Clínico San Carlos
SaludMadrid
Comité de Experimentación Animal
Comunidad de Madrid

Dña. Mar García Arenillas
Secretaría del CEEA- Hospital Clínico San Carlos



INFORME DE EVALUACIÓN DEL ÓRGANO HABILITADO

1º. El Comité de Ética de Experimentación Animal en calidad de Órgano Habilitado en **Comisión Permanente** el día 12 de diciembre de 2016 (Acta 12.1/2016) ha evaluado el proyecto indicado a continuación:

PROYECTO TIPO III. "Efecto de la infusión crónica de líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes de Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) en rata".

Código Interno: 16/020-III

PROCEDIMIENTOS:

1. Administración de anestesia, por vía intraperitoneal.
2. Implante de mini-bombas osmóticas en el ventrículo lateral derecho de ratas Wistar .
3. Implante de mini-bombas osmóticas en el ventrículo lateral derecho de ratas Wistar con LCR de pacientes de enfermedades no neurodegenerativas ni infecciosas.
4. Implante de mini-bombas osmóticas en el ventrículo lateral derecho de ratas Wistar con LCR de pacientes con ELA.
5. Implante de mini-bombas osmóticas en el ventrículo lateral derecho de ratas Wistar con LCR de pacientes con ELA incluyendo además el tratamiento con riluzol.
6. Administración de analgésicos, antibióticos y anti-inflamatorios por vía subcutánea.
7. Estabulación individualizada de los animales o privación a corto plazo de compañeros sociales.
8. Test de Plano Inclinado.
9. Test de Matsumoto.
10. Electromiograma.
11. Perfusión Intracardíaca con paraformaldehído 4%.

Responsable del proyecto:

Dr. Ulises Gómez Pinedo

2º. Se ha procedido a la evaluación de todos los aspectos contemplados en el artículo 34.2 del RD 53/2013 y una vez presentada la documentación/información adicional requerida, este Comité, verifica que el proyecto satisface los siguientes requisitos:

Órgano Habilitado – CEEA Hospital Clínico San Carlos

- Está justificado desde el punto de vista científico/ educativo.
- Su finalidad justifica la utilización de animales.
- Está diseñado de manera que los procedimientos se realizarán de la forma más humanitaria y respetuosa con el medio ambiente que sea posible en cada caso.

3º. En base a dicha evaluación este Comité de Ética de Experimentación Animal actuando como Órgano Habilitado confirma:

- Que todos los aspectos y requisitos sometidos a evaluación recogidos anteriormente cumplen con los requerimientos éticos y legales recogidos en el RD 53/2103.
- Se han examinado las situaciones y excepciones previstas en el punto e) del artículo 34.2 encontrando que ninguna de ellas es aplicable a este proyecto.
- El proyecto se desarrollará conforme a los requisitos de las 3Rs (reemplazo, reducción y refinamiento.).
- Que se establece como "severo" el grado de severidad máximo de los procedimientos incluidos en dicho Proyecto.
- Que el proyecto sometido a este informe de evaluación se clasifica como: Proyecto Tipo III.
- Que dicho Proyecto necesita ser evaluado de forma retrospectiva en base a sus características.

4º. Así mismo, se declara que este Proyecto ha sido evaluado sin existir conflicto de interés entre las partes implicadas en la evaluación del mismo.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos donde proceda se expide el presente documento.

Lo que firmo en Madrid, a 12 de diciembre de 2016



Dña. Mar García Arenillas
Secretaria del CEEA - Hospital Clínico San Carlos

INFORME DEL RESPONSABLE ADMINISTRATIVO DEL USUARIO

Pablo Antonio González López, con D.N.I. 01116474-P. En calidad de Responsable administrativo del usuario.

HACE CONSTAR:

Que está conforme con que se presente la solicitud al órgano competente para la autorización del proyecto titulado:

Efecto de la infusión crónica de líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) en rata.

Responsable del Proyecto: Ulises Gómez Pinedo.

Código Interno: 16/020-III

PROYECTO TIPO III

PROCEDIMIENTOS:

Procedimiento nº 1: Administración de anestesia por vía intraperitoneal.

Procedimiento nº 2: Implante de mini-bombas osmóticas en el ventrículo lateral derecho de ratas Wistar.

Procedimiento nº 3: Implante de mini-bombas osmóticas en el ventrículo lateral derecho de ratas Wistar con LCR de pacientes de enfermedades no neurodegenerativas ni infecciosas.

Procedimiento nº 4: Implante de mini-bombas osmóticas en el ventrículo lateral derecho de ratas Wistar con LCR de pacientes con ELA.

Procedimiento nº 5: Implante de mini-bombas osmóticas en el ventrículo lateral derecho de ratas Wistar con LCR de pacientes con ELA incluyendo además tratamiento con riluzol.

Procedimiento nº 6: Administración de analgésicos, antibióticos y anti-inflamatorios por vía subcutánea.

Procedimiento nº 7: Estabulación individualizada de los animales o privación a corto plazo de compañeros sociales.

Procedimiento nº 8: Test de Plano Inclinado.

Procedimiento nº 9: Test de Matsumoto.

Procedimiento nº 10: Electromiograma.

Procedimiento nº 11: Perfusión Intracardiaca con paraformaldehido 4 %..

Da el visto bueno como exigencia del anexo X. 3 del Real Decreto 53/2013.

Madrid, 4 de enero de 2017.



Fdo: Pablo Antonio González López
Responsable administrativo del usuario

CÓDIGO: 032659

Anexo 4

Macros

Para separar canales

```
dir=getDirectory("Choose a Directory");
print(dir);
splitDir=dir + "\Split\\";
print(splitDir);
File.makeDirectory(splitDir);
list = getFileList(dir);
for (i=0; i<list.length; i++) {
    if (endsWith(list[i], ".tif")){
        print(i + ": " + dir+list[i]);
        open(dir+list[i]);
        imgName=getTitle();
        baseNameEnd=indexOf(imgName, ".tif");
        baseName=substring(imgName, 0, baseNameEnd);
        run("Split Channels");
        selectWindow(imgName + " (blue)");
        rename(baseName + "-blue.tiff");
        saveAs("Tiff", splitDir+baseName + "-blue.tif");
        close();
        selectWindow(imgName + " (green)");
        saveAs("Tiff", splitDir+baseName + "-green.tif");
        close();
        selectWindow(imgName + " (red)");
        saveAs("Tiff", splitDir+baseName + "-red.tif");
        run("Close All");
    }
}
```

Para analizar la intensidad de marcaje

```
run("Set Measurements...", "area mean min limit display redirect=None decimal=3"); //Indica los valores que queremos obtener al medir. Mide los valores que estén entre el umbral mínimo y el máximo
```

```
run("8-bit");
```

```
setAutoThreshold("Default"); //Indica al threshold que el fondo de la imagen es claro
```

```
setThreshold(valor mínimo, valor máximo); //
```

```
run("Measure"); //Mide
```

Anexo 5

Artículos publicados relacionados con el proyecto de tesis

- **Moreno-Jiménez L**, Benito-Martín MS, Sanclemente-Alamán I, Matías-Guiu JA, Sancho-Bielsa F, Canales-Aguirre A, et al. Modelos experimentales murinos en la esclerosis lateral amiotrófica. Puesta al día. Neurología. 2021.
- **Moreno-Jiménez L**, Benito-Martín MS, Abad-Fernández A, Selma-Calvo B, Fernandez-Cucho N, Matias-Guiu JA, et al. Cell therapy as a treatment strategy in amyotrophic lateral sclerosis. Neurology Perspectives. 2022;2:S69-S73.

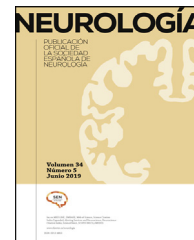
- Gomez-Pinedo, U., Cuevas, J. A., Benito-Martín, M. S., **Moreno-Jiménez, L.**, Esteban-García, N., Torre-Fuentes, L., Matías-Guiu, J. A., Pytel, V., Montero, P., & Matías-Guiu, J. (2020). Vitamin D increases remyelination by promoting oligodendrocyte lineage differentiation. *Brain and Behavior*, 10(1), e01498. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/brb3.1498>
- Gómez-Pinedo, U., García-Ávila, Y., Gallego-Villarejo, L., Matías-Guiu, J. A., Benito-Martín, M. S., Esteban-García, N., Sanclemente-Alamán, I., Pytel, V., **Moreno-Jiménez, L.**, Sancho-Bielsa, F., Vidorreta-Ballesteros, L., Montero-Escribano, P., & Matías-Guiu, J. (2021). Sera from Patients with NMOSD Reduce the Differentiation Capacity of Precursor Cells in the Central Nervous System. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(10), 5192. <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/10/5192>
- Gomez-Pinedo, U., Matias-Guiu, J., Sanclemente-Alaman, I., **Moreno-Jimenez, L.**, Montero-Escribano, P., & Matias-Guiu, J. A. (2020a). Is the brain a reservoir organ for SARS-CoV2? *Journal of Medical Virology*, 92(11), 2354-2355. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jmv.26046>
- Gomez-Pinedo, U., Matias-Guiu, J., Sanclemente-Alaman, I., **Moreno-Jimenez, L.**, Montero-Escribano, P., & Matias-Guiu, J. A. (2020b). SARS-CoV-2 as a Potential Trigger of Neurodegenerative Diseases. *Movement Disorders*, 35(7), 1104-1105. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/mds.28179>
- Gómez-Pinedo, U., Matías-Guiu, J. A., Benito-Martín, M. S., **Moreno-Jiménez, L.**, Sanclemente-Alamán, I., Selma-Calvo, B., Pérez-Suarez, S., Sancho-Bielsa, F., Canales-Aguirre, A., Mateos-Díaz, J. C., Hernández-Sapiéns, M. A., Reza-Zaldívar, E. E., Ojeda-Hernández, D. D., Vidorreta-Ballesteros, L., Montero-Escribano, P., & Matías-Guiu, J. (2021). Intranasal Administration of Undifferentiated Oligodendrocyte Lineage Cells as a Potential Approach to Deliver Oligodendrocyte Precursor Cells into Brain. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19), 10738. <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/19/10738>
- Gómez-Pinedo, U., Sanchez-Rojas, L., Benito-Martin, M. S., Lendinez, C., León-Espinosa, G., Rascón-Ramírez, F. J., Herrero, J., Castro, B., **Moreno-Jiménez, L.**, del Olmo, M., Matías-Guiu, J. A., Matias-Guiu, J., & Barcia, J. A. (2018). Evaluation of the Safety and Efficacy of the Therapeutic Potential of Adipose-Derived Stem Cells Injected in the Cerebral Ischemic Penumbra. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 27(9), 2453-2465. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2018.05.001>
- Sanclemente-Alaman, I., **Moreno-Jiménez, L.**, Benito-Martín, M. S., Canales-Aguirre, A., Matías-Guiu, J. A., Matías-Guiu, J., & Gómez-Pinedo, U. (2020). Experimental Models for the Study of Central Nervous System Infection by SARS-CoV-2 [Review]. *Frontiers in Immunology*, 11(2163). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02163>
- Torre-Fuentes, L., **Moreno-Jiménez, L.**, Pytel, V., Matías-Guiu, J. A., Gómez-Pinedo, U., & Matías-Guiu, J. (2020). Modelos experimentales de desmielinización-remielinización. *Neurología*, 35(1), 32-39. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nrl.2017.07.002>

- Gómez-Pinedo, U., Galán, L., Yáñez, M., Matias-Guiu, J., Valencia, C., Guerrero-Sola, A., Lopez-Sosa, F., Brin, J. R., Benito-Martin, M. S., Leon-Espinosa, G., Vela-Souto, A., Lendinez, C., Guillamon-Vivancos, T., Matias-Guiu, J. A., Arranz-Tagarro, J. A., Barcia, J. A., & Garcia, A. G. (2018). Histological changes in the rat brain and spinal cord following prolonged intracerebroventricular infusion of cerebrospinal fluid from amyotrophic lateral sclerosis patients are similar to those caused by the disease. *Neurologia (Barcelona, Spain)*, 33(4), 211–223. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2016.07.002>
- Galán, L., Matías-Guiu, J., Matias-Guiu, J. A., Yáñez, M., Pytel, V., Guerrero-Sola, A., Vela-Souto, A., Arranz-Tagarro, J. A., Gómez-Pinedo, U., & García, A. G. (2017). Cerebrospinal fluid cytotoxicity does not affect survival in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta neurologica Scandinavica*, 136(3), 212–216. <https://doi.org/10.1111/ane.12717>
- Gomez-Pinedo, U., Yáñez, M., Matías-Guiu, J., Galán, L., Guerrero-Sola, A., Benito-Martin, M. S., Vela, A., Arranz-Tagarro, J. A., & García, A. G. (2014). Cellular changes in motor neuron cell culture produced by cytotoxic cerebrospinal fluid from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurologia (Barcelona, Spain)*, 29(6), 346–352. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2013.08.001>
- Yáñez, M., Matías-Guiu, J., Arranz-Tagarro, J. A., Galán, L., Viña, D., Gómez-Pinedo, U., Vela, A., Guerrero, A., Martínez-Vila, E., & García, A. G. (2014). The neuroprotection exerted by memantine, minocycline and lithium, against neurotoxicity of CSF from patients with amyotrophic lateral sclerosis, is antagonized by riluzole. *Neuro-degenerative diseases*, 13(2-3), 171–179. <https://doi.org/10.1159/000357281>
- Matías-Guiu, J., Galán, L., García-Ramos, R., Barcia, J. A., & Guerrero, A. (2010). La citotoxicidad del líquido cefalorraquídeo en la esclerosis lateral amiotrófica [Cerebrospinal fluid cytotoxicity in lateral amyotrophic sclerosis]. *Neurologia (Barcelona, Spain)*, 25(6), 364–373.
- Galán, L., Matias-Guiu, J. A., Guerrero-Sola, A., & Matías-Guiu, J. (2017). Cerebrospinal fluid cytotoxicity in amyotrophic lateral sclerosis and sample size. *Acta neurologica Scandinavica*, 136(1), 79. <https://doi.org/10.1111/ane.12746>



NEUROLOGÍA

www.elsevier.es/neurologia



REVISIÓN

Modelos experimentales murinos en la esclerosis lateral amiotrófica. Puesta al día

L. Moreno-Jiménez^a, M.S. Benito-Martín^a, I. Sanclemente-Alamán^a,
J.A. Matías-Guiu^b, F. Sancho-Bielsa^c, A. Canales-Aguirre^d, J.C. Mateos-Díaz^e,
J. Matías-Guiu^{a,b}, J. Aguilar^f y U. Gómez-Pinedo^{a,*}

^a Laboratorio de Neurobiología, Instituto de Neurociencias, IdISSC, Hospital Clínico San Carlos, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España

^b Departamento de Neurología, Instituto de Neurociencias, IdISSC, Hospital Clínico San Carlos, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España

^c Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina de Ciudad Real, Universidad de Castilla-La Mancha, Ciudad Real, España

^d Unidad Preclínica, CIATEJ-CONACyT, Guadalajara, México

^e Departamento de Biotecnología Industrial, CIATEJ-CONACyT, Zapopan, México

^f Laboratorio de Neurofisiología Experimental y Circuitos Neuronales del Hospital Nacional de Paraplégicos, Toledo, España

Recibido el 10 de junio de 2021; aceptado el 8 de julio de 2021

PALABRAS CLAVE

Esclerosis lateral
amiotrófica;
SOD1;
TDP43;
FUS;
C9ORF72;
Líquido
cefalorraquídeo

Resumen

Introducción: La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa, progresiva y de etiología desconocida caracterizada por la degeneración de motoneuronas superiores e inferiores. Aproximadamente el 90% de los casos de ELA son esporádicos, mientras que el 10% restante se consideran familiares. Independientemente de si son familiares o esporádicas, los pacientes desarrollan una debilidad progresiva, atrofia muscular con espasticidad y contracturas. Por lo general, la esperanza de vida en los pacientes de ELA es de 2 a 5 años.

Desarrollo: Los modelos *in vivo* han ayudado a explicar la etiología y la patogénesis, así como los mecanismos de la ELA. Sin embargo, estos mecanismos no están del todo esclarecidos aún, por lo que los modelos experimentales son fundamentales para continuar con el estudio de los mismos, así como para la búsqueda de posibles dianas terapéuticas. A pesar de que el 90% de los casos son esporádicos, la mayoría de los modelos utilizados hasta la actualidad para estudiar la patogénesis están basados en las mutaciones genéticas asociadas a la enfermedad familiar, lo que provoca que la patogénesis de la ELA esporádica no sea aún conocida. Por tanto, sería fundamental el estudio de la enfermedad en modelos basados en la enfermedad esporádica.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: u.gomez.pinedo@gmail.com (U. Gómez-Pinedo).

<https://doi.org/10.1016/j.nrl.2021.07.007>

0213-4853/© 2021 Publicado por Elsevier España, S.L.U. en nombre de Sociedad Española de Neurología. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Cómo citar este artículo: L. Moreno-Jiménez, M.S. Benito-Martín, I. Sanclemente-Alamán et al., Modelos experimentales murinos en la esclerosis lateral amiotrófica. Puesta al día, Neurología, <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2021.07.007>

Conclusión: En el presente artículo se han revisado los principales modelos experimentales, tanto genéticos como esporádicos, utilizados en el estudio de esta enfermedad, enfocándonos en los que se han desarrollado utilizando el roedor como plataforma experimental.

© 2021 Publicado por Elsevier España, S.L.U. en nombre de Sociedad Española de Neurología. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

KEYWORDS

Amyotrophic lateral sclerosis;
SOD1;
TDP43;
FUS;
C9ORF72;
Cerebrospinal fluid

Murine experimental models of amyotrophic lateral sclerosis: An update

Abstract

Introduction: Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a progressive neurodegenerative disease whose aetiology is unknown. It is characterised by upper and lower motor neuron degeneration. Approximately 90% of cases of ALS are sporadic, whereas the other 10% are familial. Regardless of whether the case is familial or sporadic, patients will develop progressive weakness, muscle atrophy with spasticity, and muscle contractures. Life expectancy of these patients is generally 2–5 years after diagnosis.

Development: In vivo models have helped to clarify the aetiology and pathogenesis of ALS, as well as the mechanisms of the disease. However, as these mechanisms are not yet fully understood, experimental models are essential to the continued study of the pathogenesis of ALS, as well as in the search for possible therapeutic targets. Although 90% of cases are sporadic, most of the models used to study ALS pathogenesis are based on genetic mutations associated with the familial form of the disease; the pathogenesis of sporadic ALS remains unknown. Therefore, it would be critical to establish models based on the sporadic form.

Conclusion: This article reviews the main genetic and sporadic experimental models used in the study of this disease, focusing on those that have been developed using rodents.

© 2021 Published by Elsevier España, S.L.U. on behalf of Sociedad Española de Neurología. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es un desorden neurodegenerativo, progresivo y paralítico caracterizado por la degeneración de motoneuronas superiores e inferiores tanto corticales como de la médula espinal¹⁻⁵. La prevalencia de esta enfermedad es de 3-5 casos cada 100.000^{6,7}. Aproximadamente el 90% de los casos de ELA son esporádicos (SALS), mientras que el 10% restante se consideran familiares (FALS)⁶⁻⁹. Dentro de este 10% de casos familiares un 20% son debidos a la mutación de la enzima antioxidante cobre-cinc superóxido dismutasa (SOD1)⁷.

Independientemente de si son familiares o esporádicas, los pacientes desarrollan una debilidad progresiva, atrofia muscular con espasticidad y contracturas. La debilidad progresiva puede comenzar de manera distal o proximal en la parte superior o inferior de las extremidades hasta alcanzar todos los músculos, incluyendo aquellos relacionados con la respiración, habla y deglución^{7,8}. Los pacientes mueren, la mayoría, por fallo respiratorio, de 2 a 5 años después del diagnóstico^{2,3,6,8}.

En el caso de que se vean afectadas en primer lugar las motoneuronas superiores, se observa rigidez muscular y espasticidad. Por el contrario, si se ven afectadas las motoneuronas inferiores se observa una irritabilidad eléctrica excesiva, liderada por fasciculaciones espontáneas. Las principales características patológicas son la muerte de las motoneuronas de la corteza motora y de la médula espinal.

A esta degeneración de las motoneuronas se le une el proceso neuroinflamatorio que provoca una proliferación de la astrogliá, la microglía y las células oligodendrogliales. Un hallazgo común, tanto en los casos esporádicos como familiares, es la agregación citoplasmática de proteínas, siendo las más comunes TDP43, ubiquitina y en casos esporádicos de ELA, SOD1⁶.

Debido a que los mecanismos que subyacen a esta enfermedad no están del todo esclarecidos¹⁰, es fundamental el desarrollo de modelos experimentales para esclarecer los mecanismos, así como para la búsqueda de posibles tratamientos. En el presente artículo se ha realizado una actualización de los principales modelos experimentales utilizados en el estudio de esta enfermedad previamente revisados en nuestro grupo de investigación⁷, enfocándonos en los que se han desarrollado utilizando al roedor como plataforma experimental.

Desarrollo

Ratón Wobbler

Este modelo de ratón fue descubierto por primera vez por Falconer en 1956¹¹. Consiste en una mutación autosómica recesiva espontánea en la cepa C57BL/F^{12,13}. Dicha mutación se localiza en el cromosoma 11, la cual es

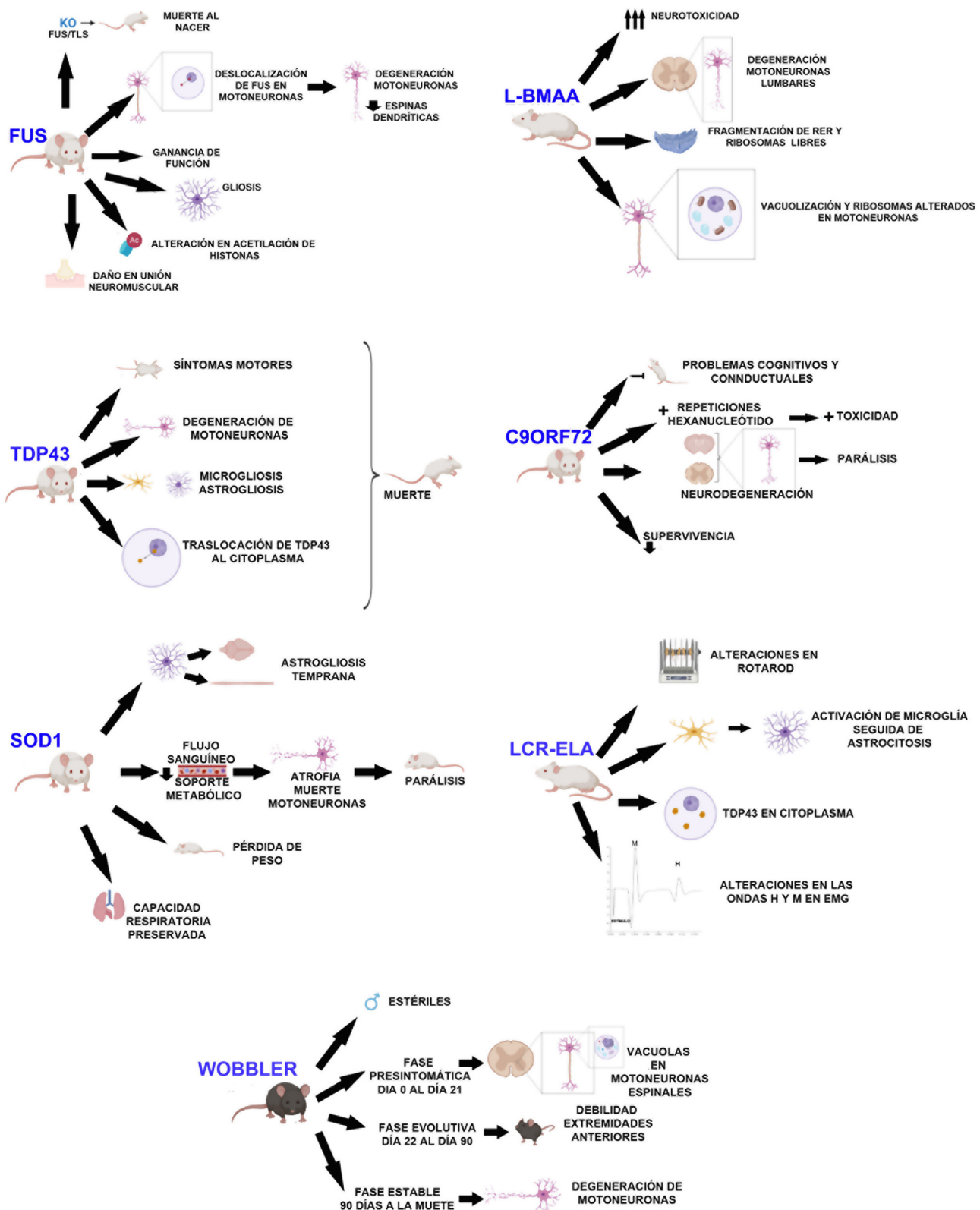


Figura 1 Modelos murinos de ELA. Se indican las principales características de cada modelo.

homóloga de la región del genoma humano 2p13^{12,14,15}. Está relacionada con la degeneración de las motoneuronas y es causada por una mutación puntual en el último exón del gen *Vps54*, provocando un cambio de aminoácido¹²⁻¹⁵ de

leucina a glutamina en el dominio C-terminal de la proteína *Vps54*^{12,15}. Una de las principales características de este modelo es que los machos, a pesar de la normal apariencia de los aparatos genitales, son estériles¹⁶ (fig. 1).

Los síntomas que presenta se dividen en 3 fases (fig. 1): una primera fase presintomática, una evolutiva y, por último, una fase estable. En la fase presintomática, cuya duración es desde el nacimiento hasta las 3 semanas, se observan pequeños síntomas no clínicos siendo el peso, la fuerza de agarre y el reflejo de enderezamiento normales^{12,13,16}. Sin embargo, sí se observan rasgos histopatológicos, como por ejemplo la vacuolización en las motoneuronas espinales^{16,17}, marcaje débil de los cuerpos de Nissl y somas aumentados¹³. Durante la fase evolutiva, que se extiende hasta los 3 meses de edad, se observan cambios clínicos, morfológicos y moleculares, como, por ejemplo, la pérdida muscular y de peso, y el desarrollo de temblor en la cabeza. Las extremidades traseras se ven menos afectadas, sin embargo, la debilidad de las extremidades anteriores y músculos del cuello se desarrolla rápidamente. Tras la rápida progresión observada los síntomas se estabilizan, pasando por tanto a la última fase que se alarga hasta la muerte del animal. Esta fase está caracterizada por una detención de la degeneración de las motoneuronas^{12,13,16}. En esta fase es extraño observar motoneuronas vacuolizadas. Sin embargo, se observan deficiencias en las sinapsis neuromusculares¹⁶.

Este modelo se ha utilizado para testar la eficacia de tratamientos en el curso de la degeneración de motoneuronas¹⁶. La principal desventaja de este modelo es que, a pesar de que es una mutación espontánea y podría servir para estudiar los casos esporádicos de la enfermedad, esta no se ha encontrado en ningún caso humano¹². Es por ello que se considera un buen modelo para las enfermedades de motoneurona en vez de para la ELA^{12,13}.

SOD1

Rosen et al. descubrieron en 1993 las mutaciones en el gen *SOD1* (cromosoma 21) que estaban relacionadas con la ELA¹⁸⁻²⁰. Esta proteína es una metaloenzima de 153 aminoácidos que se expresa en el citosol²⁰. Su función fisiológica es catalizar la conversión de los aniones superóxidos a peróxido de hidrógeno^{1,19,21}. Las mutaciones en este gen fueron la primera causa genética descrita para la ELA^{1,19,20} y representan un total del 20% de la ELA familiar y un 1-2% de los casos esporádicos¹.

El primer modelo animal que portaba una mutación de la *SOD1* humana fue creado en 1994, siendo esta la G93A^{8,22}. Este modelo es el más utilizado para el estudio de la ELA^{23,24}, a pesar de que existen más de 10 modelos mutantes de *SOD1*, como por ejemplo *SOD1*-G37R, *SOD1*-G85R o *SOD1*-G86R²⁵. Los diferentes modelos de *SOD1* presentan variabilidad en cuanto a la edad de inicio de los síntomas clínicos, la progresión y la supervivencia, dependiendo de la mutación específica del gen, el número de copias, los niveles de expresión de la proteína o el género⁸.

Los principales hallazgos en los modelos *SOD1* son un inicio temprano de la astrogliosis y microgliosis, excitotoxicidad mediada por glutamato, déficits en el transporte axonal, vacuolización mitocondrial, procesamiento aberrante de los neurofilamentos y soporte metabólico reducido en las motoneuronas^{1,26,27} (fig. 1).

En un primer momento se pensó que la enfermedad era causada por una pérdida de la actividad, sin embargo, los ratones knock-out (KO) para *SOD1* no desarrollaban ELA^{8,22}.

Los animales *SOD1*-G93A sobreexpresan la mutación humana *SOD1*G93A. Este animal presenta signos clínicos y neuropatológicos que correlacionan con FALS, como son parálisis de las extremidades con atrofia de los músculos esqueléticos^{28,29}. Además, muestra alteraciones en las estructuras dendríticas de las motoneuronas superiores, neuronas piramidales del córtex prefrontal y en las motoneuronas inferiores del tronco del encéfalo y la médula espinal²³. La denervación muscular precede a la pérdida de las motoneuronas y a la atrofia muscular²⁹. En un estudio longitudinal, Marcuzzo et al. encontraron que la neurodegeneración en este modelo sucede desde la semana 8 en la materia blanca ventral y en los nervios periféricos antes de extenderse a la materia gris ventral en la semana 10²⁸. A pesar de la muerte de las motoneuronas, en estos ratones la capacidad respiratoria se preserva hasta el final de la enfermedad³⁰.

En una reciente investigación con estos animales se encontró que la contractilidad de los músculos precedía a la reducción de la conectividad en la unidad motora. Además, demostraron que la atrofia muscular ocurre de forma posterior a estos procesos³¹.

La reducción del flujo sanguíneo encontrada en los mutantes *SOD1*-G93A y el aumento del uso de la glucosa en la médula espinal en la fase presintomática sugieren que la pérdida de oxígeno y el desacoplamiento del metabolismo induciría la muerte de las motoneuronas¹⁰.

Este modelo ha permitido descubrir que el declive progresivo de las proyecciones corticoespinales y bulboespinales sucede anteriormente al inicio de los síntomas clínicos. Por otro lado, ratones *SOD1*-G93A presintomáticos y sintomáticos muestran una evidente astrogliosis, tanto en el cerebro como en la médula espinal. En el último estadio de la enfermedad, cuando las motoneuronas ya se han perdido, el número de astrocitos activados está aumentado en la médula espinal, el núcleo motor trigeminal del tronco del encéfalo y en la corteza motora primaria²⁵.

A pesar de la pérdida de las motoneuronas frénicas, las ratas *SOD1*-G93A, como hemos comentado anteriormente, mantienen la capacidad respiratoria (fig. 1). Además, la actividad del nervio frénico se reduce aproximadamente un 50%, lo que sugiere un mecanismo (plasticidad) compensatorio en los inputs sinápticos para suplir a las motoneuronas frénicas, amplificando así su actividad individual³⁰.

La excitotoxicidad puede aparecer debido a cambios en las propiedades eléctricas intrínsecas de las motoneuronas o debido a un incremento de las propiedades de las sinapsis excitatorias. En el modelo *SOD1*-G93A la excitabilidad intrínseca de las motoneuronas se produce en los primeros estadios incluso en el estado embrionario³².

Los ratones que sobreexpresan *SOD1*-G37R no presentan alteraciones durante los primeros meses de vida, sin embargo, comenzaban a desarrollar signos clínicos a partir de los 4 meses de edad. Presentaban disminución del movimiento, dificultad para mover y extender las extremidades, así como temblores, debilidad asimétrica en las extremidades, pérdida de peso progresiva (fig. 1) y los datos electromiográficos presentaban ondas agudas espontáneas

características de la atrofia. Los datos histológicos de estos ratones muestran vacuolas principalmente en el neuropilo del asta ventral, particularmente en las dendritas y reducción de las motoneuronas en la zona lumbar de la médula ósea³³.

Oussini et al. demostraron, utilizando ratones SOD1 (G37R), que la degeneración de las neuronas serotoninérgicas es la responsable de la hiperreflexia en estos animales. Esta hiperreflexia es un mecanismo compensatorio a los déficits motores, permitiendo el mantenimiento de la función motora tras el inicio de la enfermedad³⁴. En un estudio reciente utilizando estos ratones se ha visto que existen diferencias entre sexos en la formación de nuevas ramas axonales observando que, a pesar de que estas nuevas ramas estaban incrementadas en los ratones hembra, también presentaban mayor pérdida neuronal y denervación de las uniones neuromusculares, lo que podría ir en detrimento de la progresión de la enfermedad³⁵.

A pesar de que este modelo desarrolla la mayoría de los hallazgos neuropatológicos de ELA^{36,37}, queda por demostrar aún si estos hallazgos pueden extrapolarse a otras formas de ELA familiar o esporádica. En concreto, este mutante ha sido criticado debido a su poco valor predictivo para testar potenciales terapias³⁶.

TDP43

La proteína TDP43 se descubrió debido a sus efectos en la transcripción del virus de la inmunodeficiencia humana²⁰. Está codificada por el gen *TARDBP* en el cromosoma 1. Contiene una señal de localización nuclear (NLS)^{20,22,38}, 2 dominios de unión a RNA y una región rica en glicina, región en la cual se han identificado la mayoría de las mutaciones patogénicas para ELA²⁰. Desempeña un papel en el procesamiento del ARN y en la regulación del splicing^{20,22,38}, además de ser crítica para la función y la supervivencia de las neuronas debido a que, si se altera la NLS, aumenta la neurotoxicidad³⁸. Esto provoca que esta proteína sea el mayor componente patológico de las inclusiones citoplasmáticas en la ELA y la demencia frontotemporal (DFT). Las mutaciones de esta proteína representan al 4% de las FALS²², pero las inclusiones se encuentran en la mayoría de los casos de ELA^{22,39}.

El primer modelo transgénico de proteinopatía TDP43 fue creado por Baloh et al. en 2009. Este modelo expresa la mutación A315T bajo el control de un promotor de ratón. Estos animales generan aproximadamente 3 veces más proteína mutada que la endógena, expresándose el transgén en el cerebro y la médula espinal. En primer lugar, estos animales muestran síntomas motores a los 3 o 4 meses de edad, y a los 4 meses y medio ya no son capaces de soportar su propio peso utilizando sus extremidades para deslizarse (fig. 1). Las necropsias de estos animales muestran degeneración de los axones motores y también se observa que presentan una disminución del 20% en el número de motoneuronas respecto a los controles. Estos ratones presentan una mayor afectación de las motoneuronas superiores que el modelo SOD1^{40,41}.

La toxicidad inducida por TDP43 es dependiente de los niveles de expresión del transgén. Con una expresión intermedia de TDP43 se observa un fenotipo atenuado en comparación con los animales que expresan altos niveles de

TDP43. Tanto TDP43 wild type como la mutante son neurotóxicas si se sobreexpresan⁴².

Los ratones que sobreexpresan la TDP43 humana o una mutación de este gen asociada a la ELA presentan acumulación de ubiquitina, fragmentación de la TDP43, astrogliosis, microgliosis, degeneración axonal (fig. 1), pérdida neuronal, discapacidad motora y esperanza de vida reducida⁴³. Los ratones que sobreexpresan la mutación M337V presentan pérdida severa de motoneuronas, degeneración de la unión neuromuscular y muerte prematura³⁹ (fig. 1).

Xu Ya-Fei et al., utilizando ratones transgénicos para la TDP43 humana, determinan que la proteína TDP43 de ratón está significativamente disminuida respecto a los controles, lo que sugiere que la proteína humana podría regular la expresión de la de ratón a través de la baja regulación del ARN *Tardbp*. Pero a pesar de que la expresión de la TDP43 de ratón se reduce, esta reducción no lidera la pérdida de función ya que la TDP43 humana compensa la pérdida funcional, por tanto, este tipo de animales no serían una buena herramienta para estudiar la pérdida de la función de mTDP43⁴³.

Los ratones que expresan de forma inducible la mutación patogénica A315T en las neuronas del sistema nervioso central (SNC) muestran atrofia cortical e hipocampal temprana, asociada a la pérdida de las neuronas que expresan la TDP43 humana mutada, y astrogliosis reactiva. También observaron localización citoplasmática de la proteína (fig. 1), fragmentos fosforilados, así como una elevada ubiquitinización en el cerebro de estos ratones. De forma funcional, estos ratones presentan déficits de memoria progresivos, hiperactividad, desinhibición y discapacidad motora, siendo esta última asociada a la expresión de la TDP43 mutada y a su acúmulo en las motoneuronas alfa en la médula espinal⁴⁴.

TDP43 es un ligando de *Oxr1* (proteína de resistencia a la oxidación 1). Esta proteína pertenece a la familia de proteínas que contienen el dominio TLDc, el cual confiere la protección frente al estrés oxidativo. La sobreexpresión de la isoforma *Oxr1-C* reduce la agregación citoplasmática de la TDP43 en los mutantes M337V y Q331K, lo cual sugiere que *Oxr1* posee el potencial de reducir la enfermedad asociada a TDP43 como puede ser la disfunción mitocondrial y la apoptosis inducida por el estrés oxidativo³⁹.

Teniendo en cuenta los animales transgénicos para TDP43, Gendron y Petrucelli consideran que, al observar pocas inclusiones de TDP43, la agregación de TDP43 no sería el factor neurotóxico inicial en estos animales. Sin embargo, la deslocalización y la fragmentación observada en varios modelos sugiere que estas pueden desempeñar un papel en la neurodegeneración⁴².

FUS

Las mutaciones de Fused in Sarcoma (FUS) representan el 1% de la enfermedad esporádica y el 4% de la familiar. FUS es una proteína nuclear relacionada con múltiples pasos de la expresión génica, como la transcripción del mRNA, el *splicing*, el transporte y la traducción. En las neuronas se encuentra en axones, dendritas y sinapsis excitatorias. La mayoría de las mutaciones de FUS son mutaciones con cambio de sentido y se localizan en la secuencia del dominio C-terminal de la localización nuclear (NLS)⁴⁵. Tras el descubrimiento de la implicación de FUS en la enfermedad de

la ELA⁴⁶ se han desarrollado varios modelos animales utilizando mutaciones de esta proteína, incluyendo knockouts, y sobreexpresión tanto del FUS mutante como del wild-type⁴⁷.

Los ratones KO FUS/TLS mueren inmediatamente tras el nacimiento mostrando esterilidad e inestabilidad cromosómica^{22,48-50} (fig. 1). Las neuronas deficientes de FUS/TLS muestran unas espinas con menos densidad y morfología anómala. En este modelo no se produce pérdida de motoneuronas, por lo que la patogénesis estaría relacionada con una ganancia de función⁴⁸. Otros grupos han usado la misma técnica KO, pero han generado un modelo en el que obtienen una expresión baja del gen con una proteína truncada y no funcional. Sin embargo, en este caso solo se estudió el modelo desde un punto de vista del sistema reproductivo y no desde la neuropatología⁴⁹. Recientemente, se ha estudiado la neuropatología del modelo KO observándose pérdida de peso, pero no fenotipo motor y siendo el número de las neuronas acetilcolinesterasa positivas normal. La falta del fenotipo motor y la neurodegeneración en estos ratones sugiere que la disminución solo de FUS es insuficiente para causar los síntomas de ELA⁴⁹.

Scekic-Zahirovic et al. generaron un modelo de ratón condicional knock-in en el cual se eliminaron tanto NLS como FUS. Con este modelo vieron que FUS estaba completamente deslocalizado en el citoplasma de los ratones homocigotos, lo que provocaba la degeneración de las motoneuronas en neonatos. Los ratones heterocigotos muestran parcialmente la enfermedad FUS-ELA. Con ello demostraron que la mutación en FUS está asociada a la degeneración de motoneuronas a través de la deslocalización de FUS en estas células (fig. 1), mientras que el daño axonal y la desmielinización ocurre independientemente de la expresión del mutante FUS en la motoneuronas⁴⁵.

La sobreexpresión de FUS, tanto wild type como mutante, desencadena la degeneración de las motoneuronas, sugiriendo que la proteína mutante tiene una ganancia de función tóxica que lidera la neurodegeneración más agresiva⁴⁵. La sobreexpresión de hFUSwt muestra un fenotipo más agresivo en los homocigotos, que desarrollan discapacidad motora, la cual desemboca en parálisis, y muestran un aumento de la FUS citoplasmática pero no son inclusiones ubiquitinadas. Se observa pérdida de motoneuronas en el asta anterior de la médula lumbar, daño en la unión neuromuscular (fig. 1) y gliosis^{22,50}.

Devoy et al. han generado un modelo murino que consiste en introducir en el locus del gen FUS de ratón la mutación FUSDelta14 humana, la cual se relaciona con la ELA. Este modelo sintetiza la enfermedad FUS-ELA humana definida por un inicio con mediana edad y una progresiva degeneración de las motoneuronas con una herencia dominante. Los resultados se obtuvieron del análisis del comportamiento motor, fisiología muscular para evaluar la inervación y la función de los músculos de las extremidades y análisis patológico de las motoneuronas espinales⁴⁷.

En ratas, Huang et al. han generado un modelo transgénico de FUS mutante, el cual desarrolla axonopatía severa de las motoneuronas, denervación de los músculos esqueléticos y pérdida sustancial de las neuronas corticales e hipocampales. Sin embargo, ratas transgénicas con la FUS normal muestran déficits en la memoria y aprendizaje espacial, pérdida de neuronas corticales e hipocampales, acompañada de

agregación de ubiquitina y reacción glial, desarrollando así algunos de los síntomas de la ELA y la DFT⁴⁶.

Recientemente, se ha encontrado en diversos modelos animales que existe una homeostasis aberrante de las marcas epigenéticas. Una de estas marcas que están alteradas es la acetilación de las histonas. La supervivencia neuronal se ve afectada si existe un descenso en la acetilación de histonas (fig. 1). Rossaert et al. evaluaron la eficacia de un inhibidor (ACY-738) de deacetilasas sobre el fenotipo de un ratón FUS. Encontraron que el tratamiento con este inhibidor reestablecía la acetilación de histonas además de las vías metabólicas en la médula espinal, lo cual provocaba que la progresión de la enfermedad fuera menor. Esto sugeriría que las histonas deacetilasas pueden ser una posible diana terapéutica⁵¹.

C9ORF72

Las expansiones del hexanucleótido en C9ORF72 son la causa genética más frecuente de la ELA (aproximadamente representa al 35-45% de las FALS). La función de C9ORF72 es desconocida, pero se ha sugerido que tendría un papel en el tráfico de proteínas⁵²⁻⁵⁴. Las expansiones ocurren en la parte no codificante del gen⁵³. Se han descrito 3 mecanismos posibles para la patogenicidad de estas expansiones: secuestro de las proteínas de unión al RNA, toxicidad mediada por dipéptidos formados como resultado de la traducción no ATG asociada a la repetición y la haploinsuficiencia^{52,55,56}.

Utilizando ratones con una reducción crónica de C9ORF72 o expresando el gen humano con diferentes expansiones, se ha identificado una ganancia de toxicidad como mecanismo central de la enfermedad en el sistema nervioso central de los mamíferos⁵³. Eliminando los 2 alelos del gen, se produce en los ratones esplenomegalia, aumento de los nódulos linfáticos cervicales y muerte prematura, además de déficits cognitivos en memoria de trabajo y evaluación de la ansiedad^{22,53} (fig. 1).

Los ratones donde la expansión de la mutación está dirigida por las regiones reguladoras humanas muestran diferentes fenotipos incluyendo parálisis, comportamiento similar a la ansiedad, descenso en la supervivencia, la neurodegeneración generalizada en el cerebro y la médula espinal, siendo significativo en la corteza y el hipocampo⁵⁷ (fig. 1).

Koppers et al. sugieren que la pérdida de C9ORF72 por sí misma es insuficiente para causar la ELA, sin embargo, no descartan la posibilidad de que la pérdida de función module el proceso de la enfermedad e influya en el inicio, la severidad y la duración⁵².

En contraste, otros investigadores se basan en la ganancia de función; utilizando ratones en los que se inducen 66 expansiones mediante AAV, se observa que los cerebros de estos ratones muestran los hallazgos de la ELA como con la enfermedad TDP43 o los déficits de comportamiento. Otros estudios han encontrado también inclusiones ubiquitinadas, pero no en las poblaciones neuronales relevantes y, por lo tanto, sin desarrollar el fenotipo motor⁵².

Recientemente 2 grupos han generado modelos de ratón que expresaban proteínas de repetición de dipéptidos^{56,58}. Choi et al. generaron un modelo en el cual consiguen que los cerebros de estos ratones expresen menores niveles del

dipéptido GR₈₀ mediante el control de un promotor inducible. Estos ratones muestran de manera asociada a la edad los mismos déficits de comportamiento social y deterioro de la función sináptica que se observa en la ELA, además de un ligero aumento de la muerte neuronal, microgliosis y astrogliosis. Por otro lado, presentan un déficit en la morfología y en la función de las mitocondrias. Este daño podría ser uno de los primeros eventos patogénicos que suceden en la enfermedad, ya que se observa previamente a los déficits de comportamiento y celulares⁵⁸. Hao et al. también generaron un modelo transgénico, en el cual los animales expresaban específicamente poly-PR (GFP-PR₂₈). Los ratones heterocigotos presentaban déficits motores, pérdida de células de Purkinje, activación de la microglía y de los astrocitos en el cerebelo además de en la médula espinal. Además, la transmisión sináptica estaba desregulada en estos ratones, todo ello correlaciona con la enfermedad de la ELA. Sin embargo, los ratones homocigotos morían prematuramente (fig. 1) presentado altos déficits motores, posiblemente debido a la alta toxicidad de este dipéptido⁵⁶.

Modelo químico

Beta-N-metilamino-L-alanina (L-BMAA) es un aminoácido no proteico e hidrofílico producido por cianobacterias. Es altamente neurotóxico³⁶ (fig. 1). Este aminoácido está relacionado con diferentes enfermedades neurodegenerativas^{36,59,60}. La primera relación que se estableció entre L-BMAA y las enfermedades neurodegenerativas fue en la isla de Guam, en la que se vio una relación entre este aminoácido y el síndrome ELA-párkinson ligado a demencias, aunque esta hipótesis es controvertida⁵⁹. En los pacientes de ELA, L-BMAA se acumula en el SNC como un aminoácido libre o integrado en proteínas. Tanto en la enfermedad esporádica como en la familiar se observan estos agregados en el cerebro, lo que nos indicaría que se ven afectados mecanismos como el de la autofagia⁶¹.

Se postularon 3 mecanismos por los cuales este compuesto provoca su efecto neurotóxico: la activación directa de los receptores NMDA, la activación de los receptores de glutamato metabotrópicos y la inducción del estrés oxidativo⁵⁹.

De Munck et al., mediante inyecciones intraperitoneales, realizaron un análisis de las dosis que deben administrar y sus efectos, para así realizar una correlación entre los resultados obtenidos y enfermedades como la ELA, con el fin de buscar un modelo de ELA esporádica. Según sus resultados, la dosis 300 mg/kg durante 5 días consecutivos es la dosis idónea para este modelo. En los animales tratados observaron que no existían diferencias en cuanto al peso, por lo que el desarrollo general no se veía afectado. Estos animales presentan déficits neuronales desde el día siguiente al inicio del tratamiento, así como dificultades en la coordinación motora. Mediante microscopía electrónica observaron que las motoneuronas se veían afectadas a nivel de médula espinal lumbar, fragmentación de retículo endoplasmático y polirribosomas libres, además las neuronas espinales presentan inflamación, vacuolización y mitocondrias alteradas⁵⁹ (fig. 1), por lo que este modelo presenta varios de los hallazgos neuropatológicos encontrados en la ELA humana³⁶.

En un estudio posterior de este mismo grupo, realizaron la caracterización de este modelo centrándose en los posibles cambios morfométricos y de los niveles de neurotransmisores. Los resultados de dicho estudio muestran que existen varias fases en la evolución de los síntomas de los animales tratados. Una primera fase en la que se produce una rápida evolución de los síntomas que ocurre entre el primer y tercer mes tras el tratamiento, posiblemente debido a la excitotoxicidad causada en el SNC. Posteriormente, una segunda fase de estabilización en la cual los síntomas se desarrollan más lentamente, debido principalmente a los reservorios de L-BMAA del cerebro. Mediante resonancias magnéticas *in vivo*, se observó una pérdida progresiva del volumen muscular de las extremidades en los animales tratados en comparación con los controles. No se observó cambio en el volumen total de la corteza cerebral. Sin embargo, el volumen de los ventrículos laterales se ve agrandado en los animales tratados³⁶. Por otro lado, también estudiaron los cambios neuroquímicos a corto plazo mediante HPLC y a largo plazo mediante espectroscopia de resonancia magnética. A corto plazo, observaron niveles elevados de glutamato y taurina en la corteza motora, mientras que los niveles de GABA se encontraban disminuidos. A largo plazo, las concentraciones de glutamato estaban significativamente aumentadas respecto a los controles, los niveles de GABA estaban significativamente disminuidos, pero en los niveles de taurina no se observaron diferencias. Estos niveles alterados tienen relación con los mecanismos excitotóxicos que están envueltos en la neurodegeneración³⁶.

Infusión líquido cefalorraquídeo

La patogénesis de la ELA esporádica no es conocida y la mayoría de los hallazgos se han realizado utilizando modelos transgénicos que no replican totalmente la enfermedad esporádica⁶². Existen diferentes estudios que confirman el efecto citotóxico del líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes de ELA en cultivo celular^{63,64}. Con estos resultados y teniendo en cuenta la cercanía del LCR a la médula espinal, podría plantearse que el LCR fuera un mecanismo de difusión de la enfermedad^{62,63}. Algunos investigadores han observado que la inyección aguda y puntual de LCR-ELA provoca cambios en canales iónicos dependientes de voltaje de sodio y potasio⁶⁴. Otros estudios indicaron que se induce estrés oxidativo en las motoneuronas⁶⁵. Ratas tratadas con LCR-ELA muestran que los parámetros obtenidos en la prueba del Rotarod (fig. 1) fueron menores que los niveles basales tomados con animales controles, además de que la fuerza de agarre de estos animales se vio seriamente afectada. También afectó a la actividad neuronal de la corteza motora⁶². Recientemente, en un estudio donde inyectaban intratecalmente LCR-ELA, observaron atrofia en las fibras musculares, una disminución de la complejidad de las uniones neuromusculares, daño ultraestructural y aumento del estrés oxidativo, lo cual sugeriría que el músculo esquelético está involucrado en la patogénesis de la ELA⁶⁶. Sin embargo, al ser inyecciones puntuales no imitan el curso temporal de la ELA y no la reproducen⁹. Es por ello que nuestro grupo se planteó el estudio de los cambios histopatológicos y funcionales tras la infusión continua de LCR-ELA. Utilizando LCR citotóxico de pacientes de ELA, se rellenaron unas

minibombas osmóticas (Alzet) las cuales se implantaron vía subcutánea, a las que se adjuntó una cánula de infusión de cerebro (Alzet) que se implantó en el ventrículo lateral derecho de los animales. Los resultados de este estudio muestran cambios citohistoquímicos en cerebro y médula espinal que se asemejan a los encontrados en los pacientes de ELA. Se observó una activación microglial seguida de una astrogliosis (fig. 1), lo cual se observa tanto en pacientes con ELA como en el modelo SOD1-G93A. Dicho evento puede apoyar la idea de que la neuroinflamación es un proceso temprano en la patogénesis de la ELA. También se obtuvo una sobreexpresión de S100B, la cual correlaciona con la supervivencia en la enfermedad. Los resultados mostraron también presencia citosólica de TDP43 colocalizada con ubiquitina (fig. 1), así como proteínas relacionadas con los cuerpos de Bunina. También se incrementaron los niveles de metalotioneína que podría indicar una reacción neuroprotectora en respuesta a la infusión de LCR-ELA citotóxico. Estos hallazgos pueden mejorar la comprensión de la patogénesis y evolución de la ELA⁹.

Conclusiones

En conclusión, cada uno de los modelos desarrollados en roedores ofrece características fisiopatológicas dentro del mosaico de la ELA, permitiendo su uso en el ensayo y desarrollo de nuevos fármacos. El avance y el desarrollo continuo de la investigación biomédica y tecnológica ha permitido mantener vigentes las investigaciones preclínicas basadas en estos modelos experimentales. Es necesario entender las limitaciones que posee cada modelo y que solo pueden describir un escenario concreto de la patología, por lo que las investigaciones deberían continuar con el único fin de encontrar dianas terapéuticas para el tratamiento de la ELA.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Philips T, Rothstein JD. Rodent models of amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Protoc Pharmacol*. 2015;69:5, <http://dx.doi.org/10.1002/0471141755.ph0567s69>, 67.1-5.67.21.
2. Chiò AP, Mora GMD, Lauria GMD. Pain in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol*. 2017;16:144–57, [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)30358-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(16)30358-1).
3. Al-Chalabi A, van den Berg LH, Veldink J. Gene discovery in amyotrophic lateral sclerosis: Implications for clinical management. *Nat Rev Neurol*. 2017;13:96–104, <http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2016.182>.
4. Tovar-y-Romo LB, Santa-Cruz LD, Tapia R. Experimental models for the study of neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Neurodegeneration*. 2009;4:31, <http://dx.doi.org/10.1186/1750-1326-4-31>.
5. Tan H, Chen M, Pang D, Xia X, Du C, Yang W, et al. LanCL1 promotes motor neuron survival and extends the lifespan of amyotrophic lateral sclerosis mice. *Cell Death Differ*. 2020;27:1369–82, <http://dx.doi.org/10.1038/s41418-019-0422-6>.
6. Brown RH, Al-Chalabi A. Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med*. 2017;377:162–72, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra1603471>.
7. Galán L, Vela A, Guerrero A, Barcia JA, García-Verdugo JM, Matias-Guiu J. [Experimental models of amyotrophic lateral sclerosis]. *Neurologia (Barcelona, Spain)*. 2007;22:381–8 [published Online First: 2007/07/05].
8. Mancuso R, Navarro X. Amyotrophic lateral sclerosis: Current perspectives from basic research to the clinic. *Prog Neurobiol*. 2015;133:1–26, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.07.004>.
9. Gómez-Pinedo U, Galán L, Yañez M, Matias-Guiu J, Valencia C, Guerrero-Sola A, et al. La infusión intracerebroventricular prolongada de líquido cefalorraquídeo procedente de pacientes con esclerosis lateral amiotrófica provoca cambios histológicos en el cerebro y la médula espinal de la rata similares a los hallados en la enfermedad. *Neurologia*. 2018;33:211–23, <http://dx.doi.org/10.1016/j.nrl.2016.07.002>.
10. Nomura E, Ohta Y, Tadokoro K, Shang J, Feng T, Liu X, et al. Imaging hypoxic stress and the treatment of amyotrophic lateral sclerosis with dimethylallylglycine in a mice model. *Neuroscience*. 2019;415:31–43, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.06.025>.
11. Falconer D. Wobbler (wr). *Mouse News Lett*. 1956;15:22.
12. Ott B, Dahlke C, Meller K, Napirei M, Schmitt-John T, Brand-Saber B, et al. Implementation of a manual for working with wobbler mice and criteria for discontinuation of the experiment. *Ann Anat*. 2015;200:118–24, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aanat.2015.03.007>.
13. Moser JM, Bigini P, Schmitt-John T. The wobbler mouse, an ALS animal model. *Mol Genet Genomics*. 2013;288:207–29, <http://dx.doi.org/10.1007/s00438-013-0741-0>.
14. Schmitt-John T. VPS54 and the wobbler mouse. *Front Neurosci*. 2015;9, <http://dx.doi.org/10.3389/fnins.2015.00381>.
15. Broch-Lips M, Pedersen TH, Riisager A, Schmitt-John T, Nielsen OB. Neuro-muscular function in the wobbler murine model of primary motor neuronopathy. *Exp Neurol*. 2013;248:406–15, <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.07.005>.
16. Boillée S, Peschanski M, Junier M-P. The wobbler mouse. *Mol Neurobiol*. 2003;28:65–106, <http://dx.doi.org/10.1385/MN:28:1:65>.
17. Meyer M, Kruse MS, Garay L, Lima A, Roig P, Hunt H, et al. Long-term effects of the glucocorticoid receptor modulator CORT113176 in murine motoneuron degeneration. *Brain Res*. 2020;1727:146551, <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2019.146551>.
18. Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*. 1993;362:59–62, <http://dx.doi.org/10.1038/362059a0>.
19. Swarup V, Julien JP. ALS pathogenesis: Recent insights from genetics and mouse models. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2011;35:363–9, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.08.006>.
20. McGoldrick P, Joyce PI, Fisher EMC, Greensmith L. Rodent models of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1832:1421–36, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.03.012>.
21. Van Damme P, Robberecht W, Van Den Bosch L. Modelling amyotrophic lateral sclerosis: Progress and possibilities. *Dis Model Mech*. 2017;10:537–49, <http://dx.doi.org/10.1242/dmm.029058>.
22. Picher-Martel V, Valdmanis PN, Gould PV, Julien JP, Dupré N. From animal models to human disease: A genetic approach for personalized medicine in ALS. *Acta*

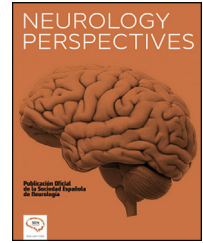
- Neuropathol Commun. 2016;4:70, <http://dx.doi.org/10.1186/s40478-016-0340-5>.
23. Fogarty MJ, Mu EWH, Lavidis NA, Noakes PG, Bellingham MC. Motor areas show altered dendritic structure in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Front Neurosci*. 2017;11, <http://dx.doi.org/10.3389/fnins.2017.00609>.
 24. Ramírez-Jarquín UN, Rojas F, van Zundert B, Tapia R. Chronic infusion of SOD1G93A astrocyte-secreted factors induces spinal motoneuron degeneration and neuromuscular dysfunction in healthy rats. *J Cell Physiol*. 2017;232:2610–5, <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.25827>.
 25. Spalloni A, Longone P. Cognitive impairment in amyotrophic lateral sclerosis, clues from the SOD1 mouse. *Neurosci Biobehav Rev*. 2016;60:12–25, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.11.006>.
 26. Hardiman O, al-Chalabi A, Chio A, Corr EM, Logroscino G, Robberecht W, et al. Amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17071, <http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2017.71>.
 27. Gois AM, Mendonça DMF, Freire MAM, Santos JR. In vitro and in vivo models of amyotrophic lateral sclerosis: An updated overview. *Brain Res Bull*. 2020;159:32–43, <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2020.03.012>.
 28. Marcuzzo S, Bonanno S, Figini M, Scotti A, Zucca I, Minati L, et al. A longitudinal DTI and histological study of the spinal cord reveals early pathological alterations in G93A-SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol*. 2017;293:43–52, <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.03.018>.
 29. Park KHJ. Mechanisms of muscle denervation in aging: Insights from a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Aging and Disease*. 2015;6:380–9, <http://dx.doi.org/10.14336/ad.2015.0506>.
 30. Seven YB, Nichols NL, Kelly MN, Hobson OR, Satriotomo I, Mitchell GS. Compensatory plasticity in diaphragm and intercostal muscle utilization in a rat model of ALS. *Exp Neurol*. 2018;299:148–56, <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.10.015>.
 31. Wier CG, Crum AE, Reynolds AB, Iyer CC, Chugh D, Palettas MS, et al. Muscle contractility dysfunction precedes loss of motor unit connectivity in SOD1(G93A) mice. *Muscle & Nerve*. 2019;59:254–62, <http://dx.doi.org/10.1002/mus.26365>.
 32. Jiang MC, Adimula A, Birch D, Heckman CJ. Hyperexcitability in synaptic and firing activities of spinal motoneurons in an adult mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience*. 2017;362:33–46, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.08.041>.
 33. Wong PC, Pardo CA, Borchelt DR, Lee MK, Copeland NG, Jenkins NA, et al. An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron*. 1995;14:1105–16, [http://dx.doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90259-7](http://dx.doi.org/10.1016/0896-6273(95)90259-7).
 34. El Oussini H, Scekcic-Zahirovic J, Vercruyse P, Marques C, Dirrig-Grosch S, Dieterlé S, et al. Degeneration of serotonin neurons triggers spasticity in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*. 2017;82:444–56, <http://dx.doi.org/10.1002/ana.25030>.
 35. Martineau É, di Polo A, Vande Velde C, Robitaille R. Sex-specific differences in motor-unit remodeling in a mouse model of ALS. *Eneuro*. 2020;7, <http://dx.doi.org/10.1523/eneuro.0388-19.2020>. ENEURO.0388-19.2020.
 36. De Munck E, Muñoz-Sáez E, Miguel BG, Solas MT, Martínez A, Arahuetes RM. Morphometric and neurochemical alterations found in l-BMAA treated rats. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2015;39:1232–45, <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2015.04.022>.
 37. Fabbriozio P, Apolloni S, Bianchi A, Salvatori I, Valle C, Lanzuolo C, et al. P2X7 activation enhances skeletal muscle metabolism and regeneration in SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Pathol*. 2020;30:272–82, <http://dx.doi.org/10.1111/bpa.12774>.
 38. Archbold HC, Jackson KL, Arora A, Weskamp K, Tank EM, Li X, et al. TDP43 nuclear export and neurodegeneration in models of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Sci Rep*. 2018;8:4606, <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-22858-w>.
 39. Williamson MG, Finelli MJ, Sleigh JN, Reddington A, Gordon D, Talbot K, et al. Neuronal over-expression of Oxr1 is protective against ALS-associated mutant TDP-43 mislocalisation in motor neurons and neuromuscular defects in vivo. *Hum Mol Genet*. 2019;28:3584–99, <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddz190>.
 40. Wegorzewska I, Bell S, Cairns NJ, Miller TM, Baloh RH. TDP-43 mutant transgenic mice develop features of ALS and frontotemporal lobar degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:18809–14, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0908767106>.
 41. Dance A. TDP-43 models coverage. *J Alzheimers Dis*. 2010;21:1403–8, <http://dx.doi.org/10.3233/jad-2010-101543> [published Online First: 2010/10/19].
 42. Gendron TF, Petrucelli L. Rodent models of TDP-43 proteinopathy: Investigating the mechanisms of TDP-43-mediated neurodegeneration. *J Mol Neurosci*. 2011;45:486, <http://dx.doi.org/10.1007/s12031-011-9610-7>.
 43. Xu Y-F, Prudencio M, Hubbard JM, Tong J, Whitelaw EC, Jansen-West K, et al. The pathological phenotypes of human TDP-43 transgenic mouse models are independent of down-regulation of mouse Tdp-43. *PLoS ONE*. 2013;8:e69864, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0069864>.
 44. Ke YD, van Hummel A, Stevens CH, Gladbach A, Ippati S, Bi M, et al. Short-term suppression of A315T mutant human TDP-43 expression improves functional deficits in a novel inducible transgenic mouse model of FTLTDP and ALS. *Acta Neuropathol*. 2015;130:661–78, <http://dx.doi.org/10.1007/s00401-015-1486-0>.
 45. Scekcic-Zahirovic J, Oussini HE, Mersmann S, Drenner K, Wagner M, Sun Y, et al. Motor neuron intrinsic and extrinsic mechanisms contribute to the pathogenesis of FUS-associated amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathologica*. 2017;133:887–906, <http://dx.doi.org/10.1007/s00401-017-1687-9>.
 46. Huang C, Zhou H, Tong J, Chen H, Liu YJ, Wang D, et al. FUS transgenic rats develop the phenotypes of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration. *PLoS Genet*. 2011;7:e1002011, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1002011>.
 47. Devoy A, Kalmar B, Stewart M, Park H, Burke B, Noy SJ, et al. Humanized mutant FUS drives progressive motor neuron degeneration without aggregation in FUSDelta14 knockin mice. *Brain*. 2017;140:2797–805, <http://dx.doi.org/10.1093/brain/awx248>.
 48. Van Den Bosch L. Genetic rodent models of amyotrophic lateral sclerosis. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:348765, <http://dx.doi.org/10.1155/2011/348765>.
 49. Nolan M, Talbot K, Ansorge O. Pathogenesis of FUS-associated ALS and FTD: Insights from rodent models. *Acta Neuropathol Commun*. 2016;4:99, <http://dx.doi.org/10.1186/s40478-016-0358-8>.
 50. Funikov SY, Rezykh AP, Mazin PV, Morozov AV, Maltsev AV, Chicheva MM, et al. FUS(1-359) transgenic mice as a model of ALS: Pathophysiological and molecular aspects of the proteinopathy. *Neurogenetics*. 2018;19:189–204, <http://dx.doi.org/10.1007/s10048-018-0553-9>.
 51. Rossaert E, Pollari E, Jaspers T, Van Helleputte L, Jarpe M, Van Damme P, et al. Restoration of histone acetylation ameliorates disease and metabolic abnormalities in a FUS mouse model. *Acta Neuropathol Commun*. 2019;7:107, <http://dx.doi.org/10.1186/s40478-019-0750-2>.

52. Koppers M, Blokhuis AM, Westeneng H-J, Terpstra ML, Zundel CA, Vieira de Sá R, et al. C9orf72 ablation in mice does not cause motor neuron degeneration or motor deficits. *Ann Neurol*. 2015;78:426–38, <http://dx.doi.org/10.1002/ana.24453>.
53. Jiang J, Zhu Q, Gendron Tania F, Saberi S, McAlonis-Downes M, Seelman A, et al. Gain of toxicity from ALS/FTD-linked repeat expansions in C9ORF72 is alleviated by antisense oligonucleotides targeting GGGGCC-containing RNAs. *Neuron*. 2016;90:535–50, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2016.04.006>.
54. Lutz C. Mouse models of ALS: Past, present and future. *Brain Res*. 2018;1693:1–10, <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2018.03.024>.
55. Batra R, Lee CW. Mouse models of C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal dementia. *Front Cell Neurosci*. 2017;11, <http://dx.doi.org/10.3389/fncel.2017.00196>.
56. Hao Z, Liu L, Tao Z, Wang R, Ren H, Sun H, et al. Motor dysfunction and neurodegeneration in a C9orf72 mouse line expressing poly-PR. *Nat Commun*. 2019;10:2906, <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-10956-w>.
57. Liu Y, Pattamatta A, Zu T, Reid T, Bardhi O, Borchelt DR, et al. C9orf72 BAC mouse model with motor deficits and neurodegenerative features of ALS/FTD. *Neuron*. 2016;90:521–34, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2016.04.005>.
58. Choi SY, Lopez-Gonzalez R, Krishnan G, Phillips HL, Li AN, Seeley WW, et al. C9ORF72-ALS/FTD-associated poly(GR) binds Atp5a1 and compromises mitochondrial function in vivo. *Nat Neurosci*. 2019;22:851–62, <http://dx.doi.org/10.1038/s41593-019-0397-0>.
59. De Munck E, Muñoz-Sáez E, Miguel BG, Solas MT, Ojeda I, Martínez A, et al. β -N-methylamino- l-alanine causes neurological and pathological phenotypes mimicking Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS): The first step towards an experimental model for sporadic ALS. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2013;36:243–55, <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2013.04.007>.
60. Lee M, McGeer PL. Weak BMAA toxicity compares with that of the dietary supplement beta-alanine. *Neurobiol Aging*. 2012;33:1440–7, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.11.024>.
61. Tedeschi V, Petrozziello T, Sisalli MJ, Boscia F, Canzoniero LMT, Secondo A. The activation of mucolipin TRP channel 1 (TRPML1) protects motor neurons from L-BMAA neurotoxicity by promoting autophagic clearance. *Sci Rep*. 2019;9:10743, <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-46708-5>.
62. Sankaranarayani R, Nalini A, Rao Laxmi T, Raju TR. Altered neuronal activities in the motor cortex with impaired motor performance in adult rats observed after infusion of cerebrospinal fluid from amyotrophic lateral sclerosis patients. *Behav Brain Res*. 2010;206:109–19, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2009.09.009>.
63. Matías-Guiu J, Galán L, García-Ramos R, Barcia JA, Guerrero A. La citotoxicidad del líquido cefalorraquídeo en la esclerosis lateral amiotrófica. *Neurología*. 2010;25:364–73, <http://dx.doi.org/10.1016/j.nrl.2010.01.006>.
64. Gunasekaran R, Narayani RS, Vijayalakshmi K, Alladi PA, Shobha K, Nalini A, et al. Exposure to cerebrospinal fluid of sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients alters Nav 1.6 and Kv 1.6 channel expression in rat spinal motor neurons. *Brain Res*. 2009;1255:170–9, <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2008.11.099>.
65. Vijayalakshmi K, Alladi PA, Ghosh S, Prasanna VK, Sagar BC, Nalini A, et al. Evidence of endoplasmic reticular stress in the spinal motor neurons exposed to CSF from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurobiol Dis*. 2011;41:695–705, <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2010.12.005>.
66. Shanmukha S, Narayanappa G, Nalini A, Alladi PA, Raju TR. Sporadic amyotrophic lateral sclerosis (SALS) – skeletal muscle response to cerebrospinal fluid from SALS patients in a rat model. *Dis Model Mech*. 2018;11, <http://dx.doi.org/10.1242/dmm.031997>.



NEUROLOGY PERSPECTIVES

www.journals.elsevier.com/neurology-perspectives



REVIEW

Cell therapy as a treatment strategy in amyotrophic lateral sclerosis



L. Moreno-Jiménez^{1,ϕ}, M.S. Benito-Martín^{1,ϕ}, A. Abad-Fernández¹, B. Selma-Calvo¹, N. Fernandez-Cucho¹, J.A. Matias-Guiu², L. Galán-Davila², A. Guerrero-Sola², U. Gómez-Pinedo^{1,*}, J. Matias-Guiu^{1,2}

¹Laboratory of Neurobiology, Institute of Neurosciences, Health Research Institute of the Hospital Clínico San Carlos, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

²Department of Neurology, Institute of Neurosciences IdISSC, Hospital Clínico San Carlos, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

Received 3 November 2021; accepted 29 November 2021

KEYWORDS

Stem cells;
cell therapy;
biomaterials;
neurodegenerative
diseases;
ALS

Abstract Cell therapy and tissue engineering are promising therapeutic strategies for such neurodegenerative diseases as amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Studies of different cell types have reported promising yet contradictory results, and the development of biomaterials enabling the integration of exogenous and host cells has been slow. This review analyses the most promising results published to date and emphasises the need for further research into the clinical application of biomaterials.

© 2021 Sociedad Española de Neurología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

PALABRAS CLAVE

Células Madre;
Terapia celular;
Biomateriales;
Enfermedades
neurodegenerativas;
ELA

Terapia celular Como estrategia terapéutica en la esclerosis lateral amiotrófica

Resumen La terapia celular y la ingeniería tisular han dado un paso adelante en el desarrollo de posibles estrategias terapéuticas en enfermedades neurodegenerativas como la Esclerosis Lateral amiotrófica (ELA). Diversos tipos celulares se han ensayado tanto con resultados prometedores como contradictorios, por su parte, el desarrollo de biomateriales que favorezcan la integración de células exógenas en el huésped ha sido lento. La presente revisión pretende, abordar los resultados más prometedores y recordar el camino que aún hay por recorrer en la traslación a la clínica.

© 2021 Sociedad Española de Neurología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Corresponding author.

E-mail address: u.gomez.pinedo@gmail.com (U. Gómez-Pinedo).

ϕ Equal contribution

Introduction

Amyotrophic lateral sclerosis (ELA) is a neurodegenerative disease affecting motor neurons in the brain, brainstem, and spinal cord. It is characterised by muscle weakness and atrophy, fasciculations, spasticity, and paralysis. The average life expectancy after symptom onset is 3–5 years (1). Authorised pharmacological treatments for ALS include riluzole (a glutamate release inhibitor) and edaravone (a free radical scavenger); however, these medications only slow disease progression and have limited efficacy (2).

Over the past 2 decades, multipotent stem cell-based therapies for the treatment of such neurodegenerative and vascular diseases as stroke, Parkinson's disease, and ALS have sparked interest in promoting the restoration and regeneration of the nervous system (3). Due to the pathophysiological characteristics of the disease and the lack of a curative treatment, several research groups have focused on the development of cell therapies and the search for vehicles that promote survival of the implanted cells in a hostile environment (4). These vehicles are biocompatible natural or synthetic materials that encapsulate cells or create a scaffold that promotes the integration of the cells into the host tissue. These cells would promote modulation of the inflammation, restoration, and endogenous repair; research is currently focused on ensuring survival of the implanted cells (5–7).

Mesenchymal stem cells: A promising alternative

Mesenchymal stem cells (MSC) were first described by Friedenstein et al. (8) in 1970, in a study using bone marrow mononuclear cells as adherent clonogenic cells. They are considered fibroblast colony-forming units, and present a high in vitro replication capacity.

MSCs can be isolated from a variety of tissues, including bone marrow, muscle tissue, adipose tissue, skin, cartilage, blood vessels, menstrual blood, and tooth pulp. These cells acquire a fibroblast-like appearance, expressing such markers as CD105, CD73, and CD90; however, they do not express CD45, CD34, or CD14 (9,10).

No cases of such adverse events as teratomas have been reported with MSC therapy; these cells are therefore considered to be safe, with the added benefit that they do not present the ethical limitations associated with embryonic or fetal stem cells. MSCs present the basic properties of stem cells: self-renewal, multilineage differentiation potential, clonality, and capability to regenerate tissue in vivo. Therefore, they are considered to be multipotent cells, as they can differentiate into several mesenchymal lineages, such as those found in bone, cartilage, adipose, and muscle tissue (9,10).

The therapeutic potential of MSCs is linked to their immunoregulatory paracrine activity, with the secretion of soluble factors (secretomes), including, among others:

- Growth factors: vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor 2 (FGF-2), insulin-like growth factor 1 (IGF-1), platelet-derived growth factor (PDGF), and hepatocyte growth factor (HGF) (11).
- Anti-inflammatory factors: interleukin-10 (IL-10), transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1), and mechanisms linked to exosome and mRNA release (12,13).

Over the last 20 years, attempts have been made to extrapolate results from animal studies to human disease (14). Animal studies have yielded promising results. For example, transgenic mutant *SOD1* mice have been administered MSCs via intrathecal or intravenous injection, or a combination of the 2 routes; the procedure has been found to be safe and to effectively delay motor impairment, reduce inflammation, and promote the secretion of cytokines and growth factors that increase cell survival, allowing animals to live longer (15,16).

Mesenchymal stem cells for the treatment of neurological diseases

MSCs are promising candidates for regenerative medicine thanks to their paracrine properties (10). When nervous tissue is damaged, the accumulation of inflammatory cells, fibroblasts, and astrocytes causes MSCs to secrete a variety of factors, including glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), VEGF, IGF-1, nerve growth factor (NGF), ciliary neurotrophic factor (CNTF), and neurotrophin 3 (NT-3), in order to promote motor neuron survival. The paracrine action of these factors protects nervous tissue from fibrosis, apoptosis, and oxidative stress, promotes angiogenesis, and has immunomodulatory and neuroprotective effects (17,18).

Clinical trials

Clinical trials using MSCs (both adipose tissue- and bone marrow-derived) to treat patients with ALS have provided useful information about the safety and efficacy of this therapy (19). Other studies have evaluated the administration route (intravenous, intrathecal, or intramuscular) and dosing (single dose or repeated doses) over variable follow-up periods. A total of 93 clinical trials have been completed to date, providing data of considerable clinical interest; table 1 shows the 10 most recently concluded clinical trials providing satisfactory results (see Table 1). Different research groups report a lack of adverse reactions and improvements in quality of life, mainly due to delays in the need for gastrostomy tube feeding/parenteral nutrition and respiratory support and to longer patient survival.

It should be noted that only one clinical trial reported adverse reactions, and was therefore suspended. This trial evaluated the safety and efficacy of infusion of autologous bone marrow-derived MSCs in 6 patients, and reported neurological symptoms not attributable to the disease (ClinicalTrials.gov identifier: NCT01082653).

ALS: amyotrophic lateral sclerosis; HYNR-CS: bone marrow-derived mesenchymal stem cells; MSC: mesenchymal stem cell; MSC-NTF: mesenchymal stem cells secreting neurotrophic factors.

Interestingly, and despite their limited results, these trials use electromyography to guarantee that intrathecal injection does not cause adverse effects due to displacement of the spinal cord parenchyma (20,21,22).

All the clinical trials completed to date used MSCs. Their results consistently show that (23,24):

1. MSC therapy is safe and viable, despite the small number of participants included.

Table 1 The 10 most recent completed clinical trials, from a total of 93 trials published on clinicaltrials.gov.

#	Title	Condition	Intervention	Hospital/country
1	A dose-escalation safety trial for intrathecal autologous mesenchymal stem cell therapy in amyotrophic lateral sclerosis	• ALS	Biological: autologous MSCs	• Mayo Clinic. Rochester, Minnesota, United States
2	Effect of intrathecal administration of haematopoietic stem cells in patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS)	• ALS	Biological: intrathecal autologous stem cells	• Haematology Department, Hospital Universitario Monterrey. Nuevo León, Mexico
3	Autologous multipotent mesenchymal stromal cells in the treatment of amyotrophic lateral sclerosis	• Motor neuron disease/ALS	Biological: suspension of human autologous MSCs 3P in 1.5 mL	• Neurology Department, University Hospital Motol. Prague, Czech Republic
4	Phase 2, randomised, double blind, placebo controlled multicenter study of autologous MSC-NTF cells in patients with ALS	• ALS	Biological: autologous MSC-NTF	• Massachusetts General Hospital. Boston, Massachusetts, United States • UMass Medical School. Worcester, Massachusetts, United States • Mayo Clinic. Rochester, Minnesota, United States
5	Safety study of HLA-haplo matched allogenic bone marrow derived stem cell treatment in amyotrophic lateral sclerosis	• Motor neuron disease • Neuromuscular disease • ALS	Genetic: HLA-haplo–matched allogenic bone marrow derived stem cells	• Hanyang University Seoul Hospital, Cell Therapy Center for Neurologic Disorders. Seoul, Haengdang-dong, Seongdong-gu, Republic of Korea
6	Escalated application of mesenchymal stem cells in amyotrophic lateral sclerosis patients	• Motor neuron disease	Biological: autologous MSCs	• Hospital e Maternidade Dr. Christóvão da Gama. Santo Andre, São Paulo, Brazil • IEP São Lucas. São Paulo, Brazil
7	Autologous cultured mesenchymal bone marrow stromal cells secreting neurotrophic factors (MSC-NTF), in ALS patients	• ALS	Biological: autologous MSC-NTF	• Hadassah Medical Organisation. Jerusalem, Israel
8	Autologous mesenchymal bone marrow stromal cells secreting neurotrophic factors (MSC-NTF), in patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS)	• ALS	Biological: autologous MSC-NTF	• Hadassah Medical Organisation. Jerusalem, Israel
9	Safety and efficacy study of autologous bone marrow derived stem cell treatment in amyotrophic lateral sclerosis	• ALS	Biological: HYNR-CS	• Hanyang University Hospital. Seoul, Republic of Korea
10	Compassionate treatment: an exploratory clinical trial to assess treatment of amyotrophic lateral sclerosis	• ALS	• Autologous adipose tissue–derived stem cells	• China Medical University Beigang Hospital. Beigang, Yunlin, Taiwan

https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=cell+therapy&cond=ALS&Search=Apply&recrs=e&age_v=&gndr=&type=&rslt=

2. MSC therapy achieves a transient delay in the natural course of the disease.

3. Neurotrophic factors play a major role in neuronal survival and represent a promising therapeutic strategy for ALS.

Biomaterials and stem cells in amyotrophic lateral sclerosis

No clinical trial of cell therapy and biomaterials for the treatment of ALS is currently underway. All studies are still in the preclinical phase (both in vitro and in vivo studies) (25,26); their primary objective is to generate a suitable

microenvironment enabling the implanted cells to survive the adverse conditions caused by the disease. One example is the study by Kalkowski et al., (27) who used a sodium alginate–based hydrogel rich in Mn^{2+} ions, which promotes a favourable environment for the implanted cells and constitutes an excellent contrast medium for MRI guidance since it produces a strong T1 signal. Vieira et al. (28) used methacrylated gellan gum and hyaluronic acid hydrogel blends as a culture medium for the cell suspension and subsequently injected cells intrathecally, obtaining similar results to those reported for sodium alginate–based hydrogel.

Cell therapy tourism

The results of previous studies into cell therapy for ALS are controversial (29). However, clinics in different countries across Europe, Asia, and Latin America have been reported to advertise “miracle” treatments for severe illnesses. These clinics purport to cure patients with stem cell-based therapy. They operate on the basis of controversial legislation allowing the use of cell therapies whose efficacy has not been confirmed by studies complying with such international regulatory bodies as the United States Food and Drug Administration or the European Medicines Agency, or following the International Society for Stem Cell Research guidelines (30).

Conclusions

Cell therapy has emerged as a promising treatment strategy for ALS, and constant advances are being made in the use of biomaterials that enhance the benefits of stem cells. However, much remains to be understood. Further research in the form of basic studies and well-designed clinical trials following the applicable regulations may shed light on these promising therapeutic strategies.

Conflicts of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.neurop.2021.11.005>.

References

- Gómez-Pinedo, U., Galán, L., Yañez, M., Matias-Guiu, J., Valencia, C., Guerrero-Sola, et al., (2018). La infusión intracerebroventricular prolongada de líquido cefalorraquídeo procedente de pacientes con esclerosis lateral amiotrófica provoca cambios histológicos en el cerebro y la médula espinal de la rata similares a los hallados en la enfermedad. *Neurología*, 33(4), 211–223. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2016.07.002>
- Jaiswal MK. Riluzole and edaravone: A tale of two amyotrophic lateral sclerosis drugs. *Med Res Rev*. 2019 Mar;39(2):733–748. <https://doi.org/10.1002/med.21528>. Epub 2018 Aug 12. PMID: 30101496.
- Ramos-Zúñiga R, Guerrero-Cázares H, Gómez-Pinedo U, Matias-Guiu J. Editorial: The Use of Biomaterials With Stem and Precursor Cells in Diseases of the Central Nervous System; A Step to Clinical Trials. *Front Neurol*. 2021 Mar 30;12:654890. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.654890>. PMID: 33859611; PMCID: PMC8042147
- Tavakol-Afshari J, Boroumand AR, Farkhad NK, Adhami Moghadam A, Sahab-Negah S, Gorji A. Safety and efficacy of bone marrow derived-mesenchymal stem cells transplantation in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Regen Ther*. 2021;16(18):268–74. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2021.07.006>. PMID: 34466632; PMCID: PMC8377537 Aug.
- Xu X, Shen D, Gao Y, Zhou Q, Ni Y, Meng H, Shi H, Le W, Chen S, Chen S. A perspective on therapies for amyotrophic lateral sclerosis: can disease progression be curbed? *Transl Neurodegener*. 2021 Aug 10;10(1):29. <https://doi.org/10.1186/s40035-021-00250-5>. PMID: 34372914; PMCID: PMC8353789.
- Walczak PA, Perez-Esteban P, Bassett DC, Hill EJ. Modelling the central nervous system: tissue engineering of the cellular microenvironment. *Emerg Top Life Sci*. 2021;5(4):507–17. <https://doi.org/10.1042/ETLS20210245> Oct 29. PMID: 34524411.
- Ferreira H, Amorim D, Lima AC, Pirraco RP, Costa-Pinto AR, Almeida R, Almeida A, Reis RL, Pinto-Ribeiro F, Neves NM. A biocompatible and injectable hydrogel to boost the efficacy of stem cells in neurodegenerative diseases treatment. *Life Sci*. 2021 Oct;27:120108. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.120108> Epub ahead of print: 34717909.
- Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*. 1970;3(4):393–403. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x> Oct. PMID: 5523063.
- Ding DC, Shyu WC, Lin SZ. Mesenchymal stem cells. *Cell Transplant*. 2011;20(1):5–14. <https://doi.org/10.3727/096368910X> PMID: 21396235.
- Ma S, Xie N, Li W, Yuan B, Shi Y, Wang Y. Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ*. 2014 Feb;21(2): 216–25. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.158>. Epub 2013 Nov 1. PMID: 24185619; PMCID: PMC3890955.
- Merimi M, El-Majzoub R, Lagneaux L, Moussa Agha D, Bouhittit F, Meuleman N, Fahmi H, Lagwalle P, Fayyad-Kazan M, Najjar M. The Therapeutic Potential of Mesenchymal Stromal Cells for Regenerative Medicine: Current Knowledge and Future Understandings. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Aug 18;9:661532. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.661532>. PMID: 34490235; PMCID: PMC8416483
- Arabpour M, Saghadzadeh A, Rezaei N. Anti-inflammatory and M2 macrophage polarisation-promoting effect of mesenchymal stem cell-derived exosomes. *Int Immunopharmacol*. 2021 Aug;97: 107823. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107823>. Epub 2021 Jun 5. PMID: 34102486.
- Racchetti G, Meldolesi J. Extracellular Vesicles of Mesenchymal Stem Cells: Therapeutic Properties Discovered with Extraordinary Success. *Biomedicines*. 2021;9(6):667. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9060667>. PMID: 34200818; PMCID: PMC8230522. Jun 10.
- Mazzini L, Mareschi K, Ferrero I, Vassallo E, Oliveri G, Nasuelli N, Oggioni GD, Testa L, Fagioli F. Stem cell treatment in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Neurol Sci*. 2008 Feb 15;265 (1–2):78–83. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jns.2007.05.016>. Epub 2007 Jun 19. PMID: 17582439.
- Forostyak S, Jendelova P, Kapcalova M, Arboleda D, Sykova E. Mesenchymal stromal cells prolong the lifespan in a rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *Cytotherapy*. 2011 Oct;13(9): 1036–46. <https://doi.org/10.3109/14653249.2011.592521>. Epub 2011 Jul 8. PMID: 21736505..
- Zhao CP, Zhang C, Zhou SN, Xie YM, Wang YH, Huang H, Shang YC, Li WY, Zhou C, Yu MJ, Feng SW. Human mesenchymal stromal cells ameliorate the phenotype of SOD1-G93A ALS mice. *Cytotherapy*. 2007;9(5):414–26. <https://doi.org/10.1080/14653240701376413> PMID: 17786603.
- Marconi S, Castiglione G, Turano E, Bissolotti G, Angiari S, Farinazzo A, Constantin G, Bedogni G, Bedogni A, Bonetti B. Human adipose-derived mesenchymal stem cells systemically injected promote peripheral nerve regeneration in the mouse model of sciatic crush. *Tissue Eng Part A*. 2012 Jun;18(11–12): 1264–72. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2011.0491>. Epub 2012 Apr 3. PMID: 22332955.
- Sykova E, Cizkova D, Kubinova S. Mesenchymal Stem Cells in Treatment of Spinal Cord Injury and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Jul 6;9:695900. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.695900>. PMID: 34295897; PMCID: PMC8290345.

19. https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=cell+therapy&cond=ALS&Search=Apply&recrs=e&age_v=&gndr=&type=&rslt=.
20. Geijo-Barrientos E, Pastore-Olmedo C, De Mingo P, Blanquer M, Gómez Espuch J, Iniesta F, Iniesta NG, García-Hernández A, Martín-Estefanía C, Barrios L, Moraleda JM, Martínez S. Intramuscular Injection of Bone Marrow Stem Cells in Amyotrophic Lateral Sclerosis Patients: A Randomised Clinical Trial. *Front Neurosci.* 2020;24(14):195. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00195>. PMID: 32265627; PMCID: PMC7105864 Mar.
21. García Santos JM, Blanquer M, Torres del Río S, Iniesta F, Espuch JG, Pérez-Espejo MÁ, Martínez S, Moraleda JM. Acute and chronic MRI changes in the spine and spinal cord after surgical stem cell grafting in patients with definite amyotrophic lateral sclerosis: post-infusion injuries are unrelated with clinical impairment. *Magn Reson Imaging.* 2013;31(8):1298–308. <https://doi.org/10.1016/j.mri.2013.05.006> Oct. Epub 2013 Jun 28. PMID: 23810205.
22. Blanquer M, Pérez Espejo MA, Iniesta F, Gómez Espuch J, Meca J, Villaverde R, Izura V, de Mingo P, Martínez-Lage J, Martínez S, Moraleda JM. Terapia celular para la esclerosis lateral amiotrófica: aspectos técnicos y resultados preliminares del estudio CMN/ELA [Bone marrow stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: technical aspects and preliminary results from a clinical trial]. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2010;32 Suppl A:31–7:Spanish Dec. PMID: 21381286.
23. Petrou P, Gothelf Y, Argov Z, Gotkine M, Levy YS, Kassir I, Vaknin-Dembinsky A, Ben-Hur T, Offen D, Abramsky O, Melamed E, Karussis D. Safety and Clinical Effects of Mesenchymal Stem Cells Secreting Neurotrophic Factor Transplantation in Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis: Results of Phase 1/2 and 2a Clinical Trials. *JAMA Neurol.* 2016;73(3):337–44. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2015.4321> Mar. PMID: 26751635.
24. Siwek T, Jezierska-Woźniak K, Maksymowicz S, Barczewska M, Sowa M, Badowska W, Maksymowicz W. Repeat Administration of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Med Sci Monit.* 2020 Dec 10;26:e927484. <https://doi.org/10.12659/MSM.927484>. PMID: 33301428; PMCID: PMC7737405.
25. Szébenyi K, Wenger LMD, Sun Y, Dunn AWE, Limegrover CA, Gibbons GM, Conci E, Paulsen O, Mierau SB, Balmus G, Lakatos A. Human ALS/FTD brain organoid slice cultures display distinct early astrocyte and targetable neuronal pathology. *Nat Neurosci.* 2021 Nov;24(11):1542–1554. <https://doi.org/10.1038/s41593-021-00923-4>. Epub 2021 Oct 21. PMID: 34675437.
26. Bell L, Fuentes AE, Healey DR, Chao R, Bakkar N, Sirianni RW, Medina DX, Bowser RP, Ladha SS, Semmineh NB, Stokes AM, Quarles CC. Longitudinal evaluation of myofiber microstructural changes in a preclinical ALS model using the transverse relaxivity at tracer equilibrium (TRATE): A preliminary study. *Magn Reson Imaging.* 2021 Oct 26:S0730-725X(21)00211–3. <https://doi.org/10.1016/j.mri.2021.10.036>. Epub ahead of print. PMID: 34715291
27. Kalkowski L, Golubczyk D, Kwiatkowska J, Holak P, Milewska K, Janowski M, Oliveira JM, Walczak P, Malysz-Cymborska I. Two in One: Use of Divalent Manganese Ions as Both Cross-Linking and MRI Contrast Agent for Intrathecal Injection of Hydrogel-Embedded Stem Cells. *Pharmaceutics.* 2021;13(7):1076. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13071076>. PMID: 34371767; PMCID: PMC8309201 Jul 13.
28. Vieira S, Strymecka P, Stanaszek L, Silva-Correia J, Drela K, Fiedorowicz M, Malysz-Cymborska I, Rogujski P, Janowski M, Reis RL, Lukomska B, Walczak P, Oliveira JM. Methacrylated gellan gum and hyaluronic acid hydrogel blends for image-guided neurointerventions. *J Mater Chem B.* 2020;8(27):5928–37. <https://doi.org/10.1039/d0tb00877j> Jul 15. PMID: 32542280.
29. Galán L, Guerrero-Sola A, Gómez-Pinedo U, Matias-Guiu J. Terapia celular en la esclerosis lateral amiotrófica: ciencia y controversia [Cell therapy in amyotrophic lateral sclerosis: science and controversy]. *Neurología.* 2010 Oct;25(8):467–9. Spanish. PMID: 20964996
30. Hyun I, Lindvall O, Ahrlund-Richter L, Cattaneo E, Cavazzana-Calvo M, Cossu G, De Luca M, Fox IJ, Gerstle C, Goldstein RA, Hermerén G, High KA, Kim HO, Lee HP, Levy-Lahad E, Li L, Lo B, Marshak DR, McNab A, Munsie M, Nakauchi H, Rao M, Rooke HM, Valles CS, Srivastava A, Sugarman J, Taylor PL, Veiga A, Wong AL, Zoloth L, Daley GQ. New ISSCR guidelines underscore major principles for responsible translational stem cell research. *Cell Stem Cell.* 2008;3(6):607–9. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.11.009> Dec 4. PMID: 19041777.