

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Estudio de las alteraciones lipídicas en el modelo murino
hSOD1G93A y de la modulación del metabolismo del
colesterol como diana terapéutica**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Luis Carlos Fernández Beltrán

DIRIGIDA POR

Silvia Corrochano Sánchez
Jorge Matías-Guiu Guía

Madrid

© Luis Carlos Fernández Beltrán, 2025

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

Estudio de las alteraciones lipídicas en el modelo murino hSOD1G93A
y de la modulación del metabolismo del colesterol como diana terapéutica

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Luis Carlos Fernández Beltrán

DIRECTORES

Silvia Corrochano Sánchez

Jorge Matías-Guiu Guía

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

Estudio de las alteraciones lipídicas en el modelo murino hSOD1G93A
y de la modulación del metabolismo del colesterol como diana terapéutica

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Luis Carlos Fernández Beltrán

DIRECTORES

Silvia Corrochano Sánchez

Jorge Matías-Guiu Guía

Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos
Programa de Doctorado en Investigación Biomédica

Índice

Abreviaturas	9
Resumen	11
Abstract	13
Introducción	17
1 Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA).....	17
1.1 Características clínicas y epidemiológicas	17
1.2 Etiología.....	18
1.3 Fisiopatología de la ELA.....	20
1.4 Tratamientos actuales para la ELA.....	24
1.5 Papel de las mutaciones en <i>SOD1</i> en la ELA.....	24
1.6 El modelo murino hSOD1 ^{G93A} como herramienta de investigación en la ELA.	26
2 Metabolismo lipídico en el Sistema Nervioso Central	28
2.1 Metabolismo de esfingolípidos	29
2.2 Metabolismo de eicosanoides.....	31
2.3 Metabolismo del colesterol.....	33
2.3.1 Biosíntesis de colesterol.....	34
2.3.2 Transporte de colesterol	38
2.3.3 Procesamiento del colesterol.....	38
2.3.4 Regulación de la homeostasis del colesterol mediante la vía de señalización de los LXR.....	40
3 Alteraciones del metabolismo lipídico en la ELA	41
3.1 Alteraciones lipídicas en la médula espinal de los pacientes de ELA.....	41
3.2 Alteraciones lipídicas en líquido cefalorraquídeo de pacientes de ELA.....	42
3.3 Alteraciones lipídicas sistémicas en pacientes de ELA.....	43
Hipótesis y Objetivos	47
Hipótesis	47
Objetivo 1	47
Objetivo 2.....	48
Objetivo 3.....	48
Materiales y Métodos	51
1 Animales.....	51
1.1 Genotipado.....	52
1.2 Análisis del número de copias del transgén hSOD1 ^{G93A}	53
2 Análisis de RNA-seq.....	54

2.1 Extracción de ARN y secuenciación.....	54
2.2 Análisis Bioinformático de la secuenciación de ARN.....	54
3 Meta-análisis de estudios de RNA-seq.....	56
4 Visualización de redes de interacción proteína-proteína.....	58
5 Validación de la expresión génica por PCR cuantitativa.....	58
6 Western-blot.....	59
7 Cultivos primarios de astrocitos.....	60
8 Tratamiento con el compuesto T0 en la dieta.....	61
9 Fenotipado del efecto del compuesto T0 en el modelo hSOD1 ^{G93A}	61
9.1 Escala Neurológica.....	62
9.2 <i>Hanging Wire</i> vertical.....	64
9.3 Test de fuerza de agarre.....	65
9.4 Rotarod.....	66
9.5 Medición del Componente de Máxima Amplitud muscular (CMAP) mediante electromiografía.....	67
9.6 Supervivencia.....	68
10 Comparativa de estudios de RNA-seq de médulas espinales de modelos murinos con mutaciones en genes relacionados con la ELA.....	68
11 Mendelian Randomization.....	69
12 Estadística.....	71
Resultados.....	75
Bloque 1. Meta-análisis del transcriptoma lipídico de la médula espinal en ratones con mutación en <i>SOD1</i>	75
1.1 Análisis del transcriptoma de la médula espinal de ratones hSOD1 ^{G93A}	75
1.2 Meta-análisis de estudios de RNA-seq de ratones hSOD1 ^{G93A}	79
1.3 Estudio de las principales vías del metabolismo de lípidos alteradas en los ratones con mutación en <i>SOD1</i>	86
1.3.1 Metabolismo de esfingolípidos.....	86
1.3.2 Metabolismo de eicosanoides.....	87
1.3.3 Metabolismo del colesterol.....	89
1.4 Validación de las alteraciones del metabolismo del colesterol en la médula espinal del ratón hSOD1 ^{G93A}	91
1.4.1 Estudio de la biosíntesis de colesterol en la médula espinal del ratón hSOD1 ^{G93A}	92
1.4.2 Estudio del transporte del colesterol en la médula espinal del ratón hSOD1 ^{G93A}	96
1.4.3 Estudio del procesamiento del colesterol en la médula espinal del ratón hSOD1 ^{G93A}	98
1.5 Estudio del metabolismo del colesterol en astrocitos primarios del ratón hSOD1 ^{G93A}	102

Bloque 2. Evaluando la vía de los LXR como diana terapéutica en la ELA.....	105
2.1 Diseño experimental y prueba piloto de la activación farmacológica de la vía de los LXR en el ratón hSOD1 ^{G93A}	106
2.2 Análisis del efecto del tratamiento con T0 en la progresión de la patología en los ratones hSOD1 ^{G93A}	112
2.3 Evaluación de la capacidad locomotora en estadios iniciales y sintomáticos en ratones hSOD1 ^{G93A} con el tratamiento T0.....	116
2.3.1 Vertical hanging wire.....	116
2.3.2 Test de fuerza de agarre.....	118
2.3.3 Test del Roratod.....	120
2.3.4 Electromiograma.....	122
2.4 Estudio del efecto del tratamiento con T0 en la supervivencia de los ratones los ratones hSOD1 ^{G93A}	124
2.5 Resumen de los efectos del tratamiento con T0 en los ratones los ratones hSOD1 ^{G93A}	126
Bloque 3. Evaluando las alteraciones del metabolismo del colesterol como un mecanismo fisiopatológico general de la ELA y no específico de mutaciones <i>SOD1</i>	127
3.1 Comparación del transcriptoma del metabolismo del colesterol en modelos murinos con mutaciones en <i>SOD1</i> , <i>TARDBP</i> y <i>FUS</i>	127
3.2 Estudio de <i>Mendelian Randomization</i> sobre el efecto que tienen factores de riesgo lipídico en el riesgo de sufrir ELA.....	132
Discusión	139
1 ¿Qué aporta el uso de los meta-análisis de estudios de RNA-seq a este trabajo?.....	139
2 ¿Qué importancia tiene las rutas lipídicas identificadas en el meta-análisis en la patología de la ELA?.....	140
2.1 Implicaciones de las alteraciones del metabolismo de esfingolípidos en la ELA.....	141
2.2 Implicaciones de las alteraciones del metabolismo de eicosanoides en la ELA.....	142
2.3 Implicaciones de las alteraciones del metabolismo de colesterol en la ELA.....	143
3 ¿Por qué la activación de la vía de los LXR es una interesante diana terapéutica en las enfermedades neurodegenerativas y más en específico en la ELA?.....	146
4 ¿Mediante que mecanismos bioquímicos la potenciación de la vía de señalización de los LXR podría estar resultando beneficiosa en el modelo hSOD1 ^{G93A} ?.....	151
4.1 Homeostasis del colesterol.....	151
4.2 Remielinización.....	152
4.3 Respuesta antiinflamatoria.....	152
4.4 Hiperlipidemia.....	153

5 ¿Es la desregulación del colesterol un mecanismo fisiopatológico específico de las mutaciones en <i>SOD1</i> ? ¿Las hay en otros modelos murinos de ELA?.....	154
6 ¿Las alteraciones del metabolismo del colesterol juegan algún papel como causa o modificador de la de la enfermedad o son únicamente consecuencias de los procesos neurodegenerativos?	156
Conclusiones	161
Referencias	163

Abreviaturas

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ADNc: Ácido Desoxirribonucleico complementario

ARN: Ácido Ribonucleico

ARNm: Ácido Ribonucleico mensajero

C9ORF72: Chromosome 9 Open Reading Frame 72

CMAP: Componente de Máxima Amplitud

DEGs: Genes diferencialmente expresados (Differentially Expressed Genes)

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Dimetil-Sulfóxido

DFT: Demencia Frontotemporal

EA: Enfermedad de Alzheimer

EAE: Encefalomiелitis Autoinmune Experimental

EH: Enfermedad de Huntington

ELA: Esclerosis Lateral Amiotrófica

ELAe: Esclerosis Lateral Amiotrófica esporádica

ELAf: Esclerosis Lateral Amiotrófica familiar

EMG: Electromiograma o Electromiografía

FUS: Fused in Sarcoma

GO: Gene Ontology

GWAS: Genome Wide Association Study

HDL: Lipoproteínas de Alta Densidad

hnRNP: Ribonucleoproteínas Nucleares Heterogéneas (Heterogeneous Nuclear Ribonucleoproteins)

IMC: Índice de Masa Corporal

iPSC: Células Madre Inducidas Pluripotentes (Induced Pluripotent Stem Cells)

KO: Knock Out

LCR: Líquido Cefalorraquídeo

LDL: Lipoproteínas de Baja Densidad

LXR: Receptores X de Hígado (Liver X Receptors)

mA: Miliamperios

NFL: Neurofilamento de cadena ligera (Neurofilament Light Chain)

ORA: Over Representation Analysis

PCA: Análisis de Componentes Principales (Principal Component Analysis)

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PFA: Paraformaldehído

qPCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa

RNA-seq: Secuenciación de ARN

rpm: Revoluciones por Minuto

SNC: Sistema Nervioso Central

SOD1: Superóxido Dismutasa 1 (Superoxide Dismutase 1)

TA: Tibialis Anterior

T0: T0901317

TDP-43: TAR DNA-binding Protein 43

Resumen

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa, multifactorial y mortal, caracterizada por la degeneración progresiva de las motoneuronas superiores e inferiores, lo que conduce a la pérdida del control de la musculatura esquelética. La esperanza de vida tras el diagnóstico se sitúa entre los 3 y 5 años, y en la actualidad no existe cura. Tanto en pacientes como en modelos animales se ha descrito una profunda dislipemia, observable tanto en el sistema nervioso central (médula espinal y líquido cefalorraquídeo) como a nivel sistémico (sangre).

A pesar de la magnitud y diversidad de las alteraciones metabólicas encontradas en pacientes con ELA, tradicionalmente se ha considerado que estas son una mera consecuencia de los procesos neurodegenerativos. Sin embargo, este proyecto de tesis parte de la hipótesis de que algunas de estas disrupciones metabólicas podrían contribuir de forma activa a la susceptibilidad a desarrollar la enfermedad y/o a modular su progresión.

Para explorar esta hipótesis, se llevó a cabo un meta-análisis de transcriptomas de la médula espinal de modelos murinos con mutación en *SOD1* en estadios tempranos (90 días de edad) y avanzados (más de 120 días), lo que permitió identificar de manera robusta varias rutas del metabolismo lipídico alteradas desde fases iniciales de la enfermedad. Entre ellas destacan el catabolismo de esfingolípidos complejos, la biosíntesis de esfingosina 1-fosfato, la síntesis de eicosanoides y la biosíntesis y transporte de colesterol.

Las alteraciones observadas en el metabolismo del colesterol sugerían la activación de un mecanismo compensatorio orientado a corregir un posible exceso de colesterol. Por este motivo, se decidió potenciar el transporte extracelular de colesterol mediante la activación farmacológica de la vía de los LXR (*Liver X Receptors*). El tratamiento con el agonista de los LXR T0901317 en ratones hSOD1^{G93A} logró enlentecer la progresión de la enfermedad, mejorar la función motora y aumentar la supervivencia.

Posteriormente, se evaluó si otros modelos murinos con mutaciones en genes asociados a la ELA presentaban alteraciones similares en el metabolismo del colesterol. El análisis transcriptómico de la médula espinal de los modelos TDP-43^{M323K} y del Fusdelta14 reveló que, en el caso del modelo TDP-43^{M323K}, también se observaba una tendencia a la represión de genes implicados en la síntesis de colesterol y la sobreexpresión de genes asociados al transporte de este lípido.

Finalmente, se realizó un estudio de aleatorización mendeliana para investigar si determinados factores de riesgo lipídicos estaban asociados con la susceptibilidad a padecer ELA. Los resultados indicaron que los factores genéticos que

predisponen a niveles elevados de LDL en sangre se asocian con un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad.

En conjunto, estos resultados sugieren que las alteraciones en el metabolismo del colesterol podrían representar una diana terapéutica prometedora en la ELA.

Abstract

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal, multifactorial neurodegenerative disease characterized by the progressive degeneration of upper and/or lower motorneurons, leading to the loss of skeletal muscle control. The average life expectancy after diagnosis is between 3 and 5 years, and there is currently no cure. Both patients and animal models of ALS display profound dyslipidemia, which can be detected not only in the central nervous system (spinal cord and cerebrospinal fluid) but also systemically in the blood.

Despite the magnitude and diversity of these metabolic disturbances, they have traditionally been viewed as mere consequences of the neurodegenerative process. However, this thesis is based on the hypothesis that some of these lipid alterations may play an active role in increasing susceptibility to ALS and/or modulating its progression.

To explore this hypothesis, a meta-analysis of transcriptomic data from the spinal cord of *SOD1* mouse models at both early (90 days) and late stages (from 120 days) of the disease was conducted. This analysis identified several lipid metabolic pathways that are consistently dysregulated from the earliest phases of neuromuscular symptomatology, including the catabolism of complex sphingolipids, the biosynthesis of sphingosine-1-phosphate, eicosanoid synthesis, cholesterol biosynthesis, and cholesterol transport.

The alterations observed in cholesterol metabolism suggested the activation of a compensatory mechanism aimed at correcting a potential excess of cholesterol. Based on this observation, we sought to enhance cholesterol efflux by pharmacologically activating the liver X receptor (LXR) pathway. Treatment with the LXR agonist T0901317 in the hSOD1^{G93A} mouse model was found to slow disease progression, improve motor performance, and extend survival.

Subsequently, we investigated whether other murine models carrying ALS-related mutations exhibited similar cholesterol metabolic alterations. Transcriptomic analysis of the spinal cord from TDP-43^{M323K} y del Fusdelta14 models revealed that the TDP-43^{M323K} mice also showed a tendency towards repression of genes involved in cholesterol biosynthesis and overexpression of genes related to cholesterol transport.

Finally, a Mendelian Randomization study was performed to assess whether certain lipid-related risk factors were associated with an increased likelihood of developing ALS. The results indicated that genetic factors predisposing to higher blood LDL levels are linked to a greater risk of ALS.

Altogether, these findings suggest that dysregulation of cholesterol metabolism may represent a promising therapeutic target in ALS.

Introducción

Introducción

1 Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA)

1.1 Características clínicas y epidemiológicas

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa multifactorial que se caracteriza por la degeneración progresiva de las motoneuronas superiores (conectan la corteza cerebral con el tronco encefálico y la médula espinal) como de las motoneuronas inferiores (transmiten la señal desde el tronco o la médula espinal hasta el músculo). Esta degeneración neuronal da lugar a un amplio espectro de síntomas motores cuya presentación inicial varía entre pacientes: en algunos casos comienzan con debilidad muscular en las extremidades (forma de inicio espinal), mientras que otros debutan con alteraciones en el habla y la deglución, conocidas como disartria y disfagia, respectivamente (inicio bulbar)¹. Estos síntomas progresan con una pérdida creciente de fuerza muscular que lleva a la parálisis y, en fases avanzadas, a la muerte, generalmente por insuficiencia respiratoria. Aunque tradicionalmente se consideraba que las funciones cognitivas permanecían preservadas, se ha demostrado que entre un 10 y un 15 % de los pacientes desarrollan demencia frontotemporal, y un 35 % presentan algún grado de deterioro cognitivo². La edad media de diagnóstico son 65 años y una vez establecido la supervivencia media es de aproximadamente de 3 a 5 años, aunque existe una gran heterogeneidad interindividual³.

Tanto en Europa como en América, la prevalencia de la ELA (número total de casos en un momento dado) varía entre 3-12 por cada 100.000 habitantes dependiendo de la región, mientras que Asia tiene una ligera menor prevalencia con datos que varían entre 2-10 casos por 100.000. En cuanto a la incidencia anual (número de casos nuevos al año) Europa es el continente con mayor incidencia con un rango de 1 a 6 nuevos casos por cada 100.000 habitantes al año. En cambio, América y Asia tienen una ligera menor incidencia con una media de 1 a 3 nuevos casos por 100.000 individuos⁴. En el caso de España, la prevalencia se sitúa entre 3 y 5 por 100.000, con una incidencia comparable a la media europea. A partir de estos datos, se estima que en el país conviven entre 4.000 y 4.500 personas con ELA, diagnosticándose unos 900 casos nuevos cada año, lo que equivale a unas tres personas diagnosticadas al día en España. La ELA constituye, tras el Alzheimer y el Parkinson, la tercera enfermedad neurodegenerativa más frecuente en España (datos aportados por la Sociedad Española de Neurología en junio de 2024).

Además, estos datos de incidencia no afectan por igual a hombres y mujeres ya que se ha observado que los hombres presentan una mayor probabilidad que las mujeres, con una proporción que varía entre 1,2-1,5:1⁵. Este factor no solo afecta a la incidencia sino ya que se ha descrito que tanto la edad de inicio como la supervivencia es menor en los hombres, poniendo de manifiesto un claro dimorfismo sexual en esta patología⁶.

1.2 Etiología

La evidencia procedente de estudios clínicos y básicos indica que la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad multifactorial, con una participación genética importante pero heterogénea. Aproximadamente un 10 % de los pacientes presentan al menos otro miembro afectado en la familia, y se clasifican como casos de ELA familiar, la mayoría de los cuales siguen un patrón de herencia autosómica dominante⁷. El 90–95 % restante corresponde a formas esporádicas, en las que no se identifica antecedentes familiares de la enfermedad⁸.

El desarrollo de tecnologías genómicas, como los estudios de asociación a nivel genómico (GWAS) y la secuenciación de nueva generación, ha permitido identificar en torno a 40 genes asociados a la ELA. No obstante, cuatro de ellos concentran la gran mayoría de los casos genéticos conocidos: *SOD1*, *TARDBP* (nombrado como TDP-43 cuando se hace referencia a la proteína en vez de al gen), *FUS* y *C9ORF72*. En Europa, estos genes explican aproximadamente el 60-65 % de los casos de ELA familiar, con una distribución estimada de mutaciones en *C9ORF72* (40 %), *SOD1* (20 %), *TARDBP* (4 %) y *FUS* (3 %). El resto de los genes con mutaciones identificados representan menos del 1 % de los casos, y por tanto el 45% restante de casos de ELA familiar no tienen una causa conocida (Figura I1). En las formas de ELA esporádica, en cambio, se identifica una causa genética conocida en menos del 10 % de los pacientes, siendo las mutaciones en el gen *C9ORF72* responsable del 5 % de los casos, mutaciones en *SOD1* el 1 %, y en *TARDBP* y *FUS* de menos del 1 % cada uno⁹ (Figura I1).

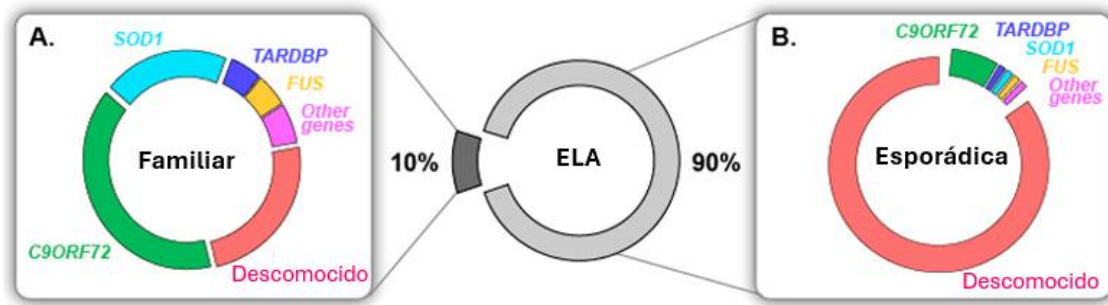


Figura 11. Porcentajes de casos familiares y esporádicos de ELA con factores genéticos conocidos. Adaptado de Laferriere F et al. 2015¹⁰

Aunque las tecnologías de secuenciación de nueva generación podrían permitir la identificación de nuevos factores monogénicos aún no descubiertos, lo más probable es que la mayoría de los casos sin causa genética conocida se deban a una combinación de factores poligénicos junto con elementos ambientales. En los últimos años, numerosos estudios han abordado el papel del “exposoma” en la predisposición a desarrollar ELA, lo que ha permitido proponer diversos factores ambientales como posibles contribuyentes a la enfermedad. Entre ellos, se ha señalado la exposición prolongada a pesticidas, disolventes orgánicos y metales pesados, aunque los resultados no son concluyentes: no todos los estudios encuentran asociaciones estadísticamente significativas, y cuando se observan, el incremento del riesgo suele ser leve¹¹.

Otro factor clásicamente vinculado a la ELA es el tabaquismo, aunque también en este caso la evidencia es controvertida. Mientras que siete estudios han descrito una asociación significativa entre fumar y el desarrollo de la enfermedad, otros catorce no han hallado relación alguna¹². La ocupación profesional también ha sido objeto de numerosos análisis epidemiológicos, y se ha descrito un mayor riesgo de ELA en personas que han trabajado como veterinarios, peluqueros, operadores de plantas energéticas, militares o deportistas profesionales¹³⁻¹⁵. Este último grupo, los atletas, es especialmente relevante, ya que la práctica de ejercicio físico intenso ha sido señalada como un posible factor de riesgo independiente¹⁶. Por ejemplo, un estudio realizado en Italia con más de 24.000 futbolistas profesionales observó una mayor incidencia de ELA en este colectivo en comparación con la población general¹⁷. El ejercicio de alta intensidad y carácter anaeróbico probablemente esté asociado con un mayor riesgo de desarrollar ELA porque este tipo de actividad depende de las fibras musculares rápidas (tipo II), en particular las IIb. Estas fibras, responsables de la contracción rápida y de esfuerzos explosivos de corta duración, son las primeras que degeneran en la enfermedad. Así, la práctica repetida de ejercicios que reclutan predominantemente este tipo de fibras rápidas IIb podría contribuir a un mayor estrés sobre las motoneuronas más vulnerables en la ELA^{18,19}. Sin embargo, se ha planteado que este aumento del

riesgo podría deberse, más que al ejercicio en sí, a factores asociados como traumatismos repetitivos, lesiones musculares o conmociones cerebrales frecuentes²⁰.

Diversos estudios caso-control han explorado la influencia de la dieta como factor ambiental en el riesgo de desarrollar ELA. En un estudio realizado en Japón, una mayor ingesta de carbohidratos se asoció con un incremento del riesgo, mientras que un consumo elevado de grasas totales, saturadas y monoinsaturadas mostró un efecto protector²¹. Por otro lado, un estudio llevado a cabo en Italia identificó que una dieta rica en carne roja y procesada, así como en sodio, zinc y aminoácidos excitotóxicos como el glutámico, se vinculaba con un mayor riesgo de ELA. En contraste, el consumo frecuente de verduras crudas, cítricos, pan integral, café y té se asoció con un menor riesgo, sugiriendo que ciertos patrones dietéticos podrían modular la susceptibilidad a la enfermedad²².

1.3 Fisiopatología de la ELA

A pesar de décadas de investigación, los mecanismos patogénicos responsables de la ELA siguen sin estar claramente definidos. Todo apunta a que no existe un único evento iniciador, sino que múltiples factores contribuyen al inicio y progresión de la enfermedad. En este sentido hay una teoría multietapa expuesta por Al-Chalabi y colaboradores que dice que la ELA podría desarrollarse como un proceso de múltiples etapas acumulativas a lo largo de la vida, donde se requieren aproximadamente seis eventos para que se manifieste la enfermedad, lo que sugiere la interacción progresiva de factores genéticos y ambientales²³. Además, la gran variabilidad genética y fenotípica entre pacientes complica la identificación de mecanismos patológicos comunes y dificulta la obtención de conclusiones generalizables. La implicación de un elevado número de genes y rutas celulares pone de manifiesto la complejidad de esta enfermedad tanto para los casos familiares como los esporádicos. A continuación, se revisarán los principales mecanismos fisiopatológicos descritos en la ELA (Figura I2):

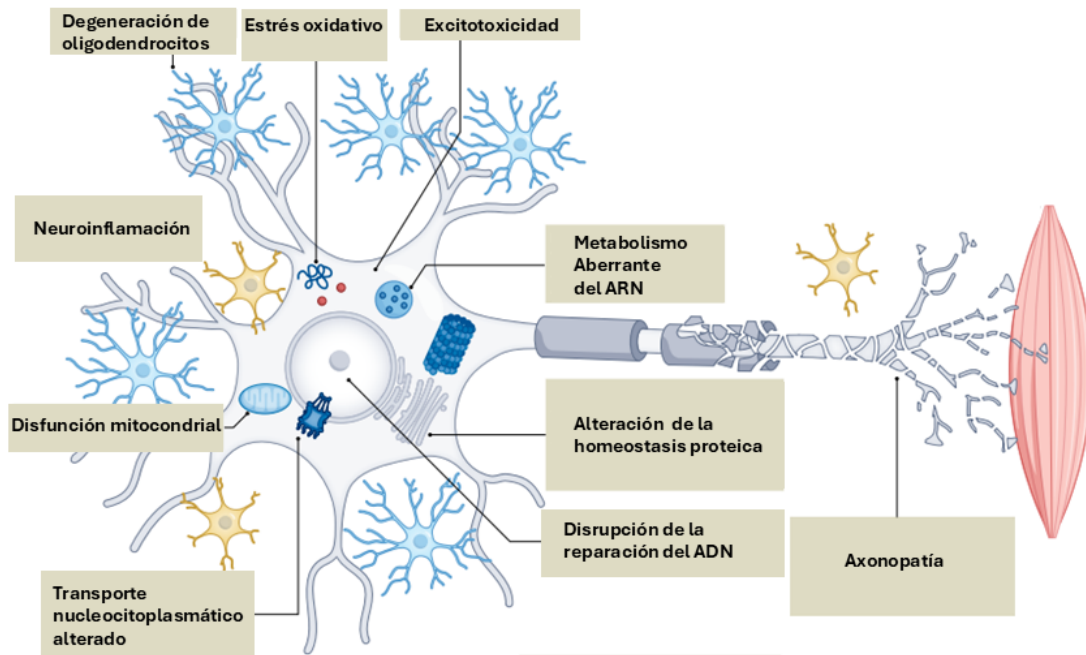


Figura 12. Principales mecanismos fisiopatológicos a nivel celular descritos en la ELA. Adaptado de Mead RJ et al., 2023²⁴.

Alteración de la homeostasis proteica

La acumulación de proteínas mal plegadas o dañadas (proteínopatías) es una característica común en las enfermedades neurodegenerativas y también se ha identificado como un rasgo central en la ELA. Los genes más frecuentemente mutados en esta enfermedad (*SOD1*, *C9ORF72*, *TARDBP* y *FUS*) codifican proteínas que tienden a formar agregados patológicos en las neuronas de los pacientes. Existe evidencia sólida de que la disfunción de las dos principales vías de degradación de proteínas, la autofagia y la del proteosoma, contribuyen a la patogénesis de la ELA. De hecho, varios genes asociados a la enfermedad, como *C9ORF72*, *OPTN*, *SQSTM1*, *VCP* y *UBQLN2*, codifican proteínas directamente implicadas en estos sistemas de eliminación de proteínas²⁵⁻²⁷.

Metabolismo aberrante del ARN

La disfunción en el metabolismo del ARN ha emergido como un mecanismo patogénico clave en la ELA, especialmente tras la identificación de mutaciones causantes de enfermedad en genes que codifican proteínas de unión al ARN, como *TARDBP*, *C9ORF72* y *FUS*. Estas proteínas desempeñan funciones esenciales en distintos procesos del metabolismo del ARN, incluyendo el empalme (*splicing*), la transcripción, el transporte, la traducción y el almacenamiento en gránulos de estrés. Curiosamente, muchas de las proteínas asociadas a ELA que se unen al ARN contienen dominios similares a priones, implicados en la formación o

dinámica de estos gránulos. Entre ellas se encuentran TDP-43 (nombrado como *TARDBP* cuando se hace referencia al gen en vez de a la proteína), FUS, TAF15, EWSR1, hnRNPA1 y hnRNPA2B1^{28,29}.

Disrupción de la reparación de ADN

La disfunción en los mecanismos de reparación del ADN es otro de los procesos que se ha propuesto como contribuyente a la patogénesis de la ELA. Dos de las proteínas más estudiadas vinculadas a la enfermedad, TDP-43 y FUS, participan en la prevención o reparación del daño genómico asociado a la transcripción³⁰. En particular, FUS desempeña un papel destacado en la reparación de roturas de doble cadena de ADN, actuando tanto en la recombinación homóloga como en la unión de extremos no homólogos^{31,32}.

Disfunción mitocondrial

La disfunción mitocondrial representa uno de los mecanismos patológicos mejor documentados en la ELA. En modelos murinos y en muestras de pacientes con mutaciones en *SOD1* se han observado alteraciones en la morfología mitocondrial y vacuolas con agregados proteicos en el espacio intermembrana. Además, se han reportado alteraciones en la funcionalidad de la cadena respiratoria y en el transporte axonal de mitocondrias, lo que podría contribuir a la degeneración en la unión neuromuscular³³. Muchas de estas disfunciones están mediadas por una comunicación anómala entre el retículo endoplásmico y la mitocondria, en la que intervienen proteínas como VAPB y PTIP51, cuya interacción se ve afectada por mutaciones en *TARDBP* y *FUS*^{34,35}. En concreto, mutaciones en *TARDBP* provoca que TDP-43 se acumule en las mitocondrias, promoviendo la disociación del complejo I respiratorio e interfiriendo con la traducción de sus subunidades. Por otro lado, en la ELA asociada a mutaciones (expansiones anómalas de hexanucleótidos) en el gen *C9ORF72*, el dipéptido repetido poli(GR) deteriora la función mitocondrial, genera estrés oxidativo y daño en el ADN³⁶. Asimismo, mutaciones en *CHCHD10*, asociadas a formas familiares de la enfermedad, afectan la estructura de las crestas mitocondriales y alteran el mantenimiento del genoma mitocondrial³⁷.

Neuroinflamación

Cada vez hay más evidencia que indica que la neuroinflamación desempeña un papel relevante en la fisiopatología de la ELA. Este proceso, asociado a la pérdida neuronal, se caracteriza por la activación de microglía y astrocitos, la sobreproducción de citocinas proinflamatorias y la infiltración de linfocitos T³⁸. El posible relevante rol de la microglía en la patogénesis de la enfermedad ha cobrado mayor relevancia tras la identificación de varios genes asociados a ELA que influyen en su función y que se expresan de forma prominente en estas células inmunitarias,

como *C9ORF72*, *TBK1* y *PGRN*³⁹⁻⁴¹. Las células del sistema inmune parecen tener un papel dual: pueden ejercer efectos neuroprotectores en fases iniciales, pero también pueden contribuir al daño neuronal en etapas más avanzadas de la enfermedad⁴².

Degeneración de oligodendrocitos

La degeneración de oligodendrocitos también ha sido descrita en la ELA. Aunque las células precursoras de oligodendrocitos muestran una proliferación aumentada en el contexto de la enfermedad, no logran completar adecuadamente las etapas finales de diferenciación⁴³. Una de las evidencias más destacadas en este sentido proviene del transportador de lactato MCT1, que se expresa de forma abundante en oligodendroglía y cuya reducción se ha observado tanto en la corteza motora de modelos murinos de ELA como en tejido de pacientes⁴⁴. Sin embargo, aún no está claro si estas alteraciones en los oligodendrocitos preceden a la pérdida neuronal o son una consecuencia secundaria de la misma.

Excitotoxicidad

La excitotoxicidad es un proceso patológico caracterizado por la sobreestimulación de los receptores de glutamato, lo que conduce a daño o degeneración neuronal. En la ELA, se ha descrito una alteración en el transportador de aminoácidos excitadores tipo 2 (EAAT2), una proteína astrocitaria encargada de la recaptación de glutamato en la sinapsis. Esta disfunción conlleva un exceso de glutamato extracelular, favoreciendo la toxicidad sobre las motoneuronas^{45,46}. No obstante, aún no está claro si los cambios en la señalización glutamatérgica constituyen un mecanismo patogénico primario o si son consecuencia de otros procesos celulares. Aunque el uso de riluzol, fármaco que actúa parcialmente reduciendo la excitotoxicidad, ha demostrado beneficios modestos en algunos pacientes, otros compuestos dirigidos a esta vía han fracasado en otros ensayos clínicos^{47,48}.

Alteraciones en el transporte axonal

El transporte axonal es un proceso fundamental que permite el desplazamiento y la distribución espacio-temporal de componentes intracelulares a lo largo del axón. La identificación de mutaciones en genes como *DCTN*, *PFN1* y *TUBA4A* en pacientes con ELA sugiere que las alteraciones en proteínas esenciales para este proceso podrían contribuir a la fisiopatología de la enfermedad. Además, se han descrito mutaciones en *NEFH*, gen que codifica la subunidad pesada de los neurofilamentos, lo que refuerza la hipótesis de que el fallo en el mantenimiento y transporte axonal puede desempeñar un papel relevante en la degeneración de las motoneuronas⁴⁹⁻⁵¹.

1.4 Tratamientos actuales para la ELA

Actualmente esta patología no tiene cura y los posibles tratamientos sintomáticos son muy escasos y proporcionan leves mejorías. El primer fármaco aprobado fue riluzol, autorizado en EEUU en 1995 y en Europa en 1996. Este fármaco inhibe la liberación presináptica de glutamato que es un neurotransmisor excitador implicado en la excitotoxicidad, uno de los mecanismos patogénicos de la ELA. El riluzol ha demostrado prolongar la supervivencia de los pacientes de 3 a 6 meses según el estudio^{52,53}.

El segundo fármaco aprobado para la ELA fue la edaravona en Japón (2015) y en EEUU (2017). La edaravona es un antioxidante que actúa por tanto reduciendo el estrés oxidativo. La eficacia de este tratamiento se ha observado en subgrupos concretos de pacientes con formas de inicio reciente y progresión rápida, mejorando de forma modesta la función motora medida por la escala ALSFRS-R^{54,55}. Sin embargo, otros estudios ponen en duda que este tratamiento proporcione una mejoría significativa⁵⁶ y es por ello que en Europa aún no se ha aprobado.

Por último, en 2023 EEUU y en 2024 Europa aprobaron el Tofersen, un oligonucleótido antisentido dirigido contra el ARN mensajero del gen *SOD1* mutado, para pacientes con ELA asociada a mutaciones en dicho gen. Su uso reduce los niveles de la proteína *SOD1* mutante y los niveles del biomarcador de daño neuronal NfL (Neurofilamento de cadena ligera) y reduce la progresión de la enfermedad, aunque su impacto clínico todavía está en fase de evaluación a largo plazo⁵⁷. Hoy en día, estos tratamientos ofrecen solo beneficios modestos, y sigue siendo urgente el desarrollo de estrategias terapéuticas más eficaces y personalizadas, o la combinación de ellas.

1.5 Papel de las mutaciones en *SOD1* en la ELA

El gen *SOD1*, que codifica la enzima superóxido dismutasa 1 (Cu/Zn), fue el primero en asociarse a la ELA en 1993⁵⁸. Esta enzima, compuesta por 153 aminoácidos, pertenece a una familia de tres superóxido dismutasas presentes en el ser humano. Su estructura forma un homodímero altamente estable que se localiza tanto en el citosol como en el espacio intermembrana de las mitocondrias. *SOD1* desempeña un papel esencial en la defensa antioxidante celular, al catalizar la conversión del anión superóxido, generado durante la respiración celular, en oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno⁵⁹. Un metaanálisis reciente estimó que las variantes

patogénicas en *SOD1* son responsables de aproximadamente el 15–30 % de los casos familiares de ELA y de alrededor del 2 % en las formas esporádicas⁶⁰.

Hasta la fecha se han identificado más de 185 mutaciones asociadas a enfermedad en *SOD1*, distribuidas a lo largo de todo el gen. La mayoría de ellas son mutaciones puntuales no sinónimas, siendo la variante D90A la más frecuente a nivel mundial. El fenotipo clínico, la duración de la enfermedad y la gravedad pueden variar considerablemente según la mutación concreta. Algunas variantes, como A4V, H43R, L84V, G85R, N86S y G93A, se asocian con una progresión rápida y menor supervivencia, mientras que otras, como G93C, D90A o H46R, se relacionan con formas más lentas de evolución y una expectativa de vida más prolongada⁶¹. Otra característica relevante de estas mutaciones es que presentan una penetrancia incompleta, lo que significa que no todos los portadores desarrollan ELA a lo largo de su vida. Se estima que la penetrancia máxima es de alrededor del 54 %, aunque varía según la variante específica. Algunas mutaciones muestran casos de portadores asintomáticos incluso en edades avanzadas, lo que sugiere la influencia de factores modificadores genéticos o ambientales⁶².

Los pacientes con mutaciones en *SOD1* suelen presentar un perfil clínico característico. En general, el inicio de los síntomas es más precoz que en otras formas de ELA, con predominio de afectación espinal —especialmente en las extremidades inferiores— y una baja frecuencia de inicio bulbar⁶³. La progresión de la enfermedad tiende a ser más lenta, con una tasa media de deterioro funcional menor y una supervivencia notablemente más prolongada en muchas variantes, aunque algunas mutaciones específicas como A4V se asocian a cursos muy agresivos⁶⁴. Aunque las alteraciones cognitivas son infrecuentes, algunos pacientes con mutaciones en *SOD1* pueden presentar rasgos conductuales sutiles, como rigidez mental o cambios de personalidad, en particular con ciertas variantes genéticas⁶⁵.

En un principio las observaciones de que estas mutaciones en *SOD1* disminuyen la actividad de la enzima llevaron a pensar en un mecanismo patológico de pérdida de función⁶⁶. Sin embargo, estudios posteriores no han encontrado correlación entre la disminución de la actividad de la enzima y la severidad de la patología. Además, los ratones *knockout* para *Sod1* no presentan patología neuromuscular⁶⁷. Todo ello sugiere que las mutaciones en *SOD1* proporcionan una ganancia de función tóxica⁶⁸. Esta hipótesis ha impulsado el desarrollo de enfoques terapéuticos dirigidos a reducir específicamente los niveles de *SOD1* mutante, como es el caso de Tofersen, un oligonucleótido antisentido diseñado para disminuir la producción de la proteína *SOD1* mutada y que por tanto su uso se vuelve muy interesante para todos los pacientes con mutaciones en *SOD1*.

1.6 El modelo murino hSOD1^{G93A} como herramienta de investigación en la ELA

Tras identificarse las mutaciones en el gen *SOD1* como el primer factor genético asociado a la ELA, se desarrollaron modelos murinos transgénicos con el objetivo de estudiar la fisiopatología de dichas alteraciones. En 1995 se publicó el modelo hSOD1^{G93A}, que hoy en día sigue siendo el más empleado tanto en investigación básica como en ensayos preclínicos sobre la enfermedad. Su amplio uso a día de hoy se justifica porque es uno de los modelos murinos que más asemeja la degeneración de las motoneuronas espinales a la ocurrida en la ELA. Este modelo se generó por microinyección pronuclear de un constructo que contenía el gen humano *SOD1* con una mutación puntual que sustituye la glicina por alanina en la posición 93 (G93A), mutación que ha sido identificada en pacientes de ELA. El transgén, que incluye el promotor endógeno humano, fue introducido en cigotos unicelulares murinos, permitiendo la integración aleatoria de múltiples copias en el genoma⁶⁹.

Las principales características de este modelo se muestran en la Figura I3. Estas características se pueden ver modificadas según el fondo genético y a continuación se comentarán las relativas al fondo C57BL/6J. El sexo es otro factor modificador ya que se ha descrito que las hembras hSOD1^{G93A} tienen un inicio más tardío, una enfermedad menos agresiva y una menor disfunción mitocondrial ligada a un efector protector de las hormonas sexuales⁷⁰.

Hasta aproximadamente los tres meses de edad (edad postnatal (p) de 90 días, p90), los animales no presentan sintomatología evidente. A partir de ese punto, comienzan a manifestar debilidad muscular y temblores en las extremidades posteriores que progresan hacia hiperreflexia y parálisis. La muerte llega de forma prematura, generalmente hacia los cinco meses de edad (p150)⁶⁹. A nivel patológico, la degeneración de las uniones neuromusculares comienza ya hacia el día 47, afectando de manera selectiva a las fibras musculares rápidas⁷¹. La pérdida axonal proximal se vuelve evidente alrededor del día 80 (p80) y coincide con el inicio del deterioro motor. Para el día 100, se observa una pérdida del 50 % de las motoneuronas espinales inferiores⁷². Entre las alteraciones histopatológicas características se incluyen la vacuolización mitocondrial⁷³, la fragmentación del aparato de Golgi⁷⁴, la presencia de inclusiones positivas para neurofilamentos y agregados citoplasmáticos inmunorreactivos para SOD1⁷⁵. Además, se observa una astrogliosis y microgliosis intensas en la médula espinal coincidiendo con el inicio clínico de la enfermedad. Cabe destacar que la patología no se limita únicamente a las motoneuronas inferiores. En este modelo también se ha documentado una degeneración progresiva dependiente de la edad de los tractos descendentes corticoespinal, bulboespinal y rubroespinal⁷⁶, lo que refuerza su

relevancia para estudiar la ELA como una enfermedad de motoneuronas superiores e inferiores.

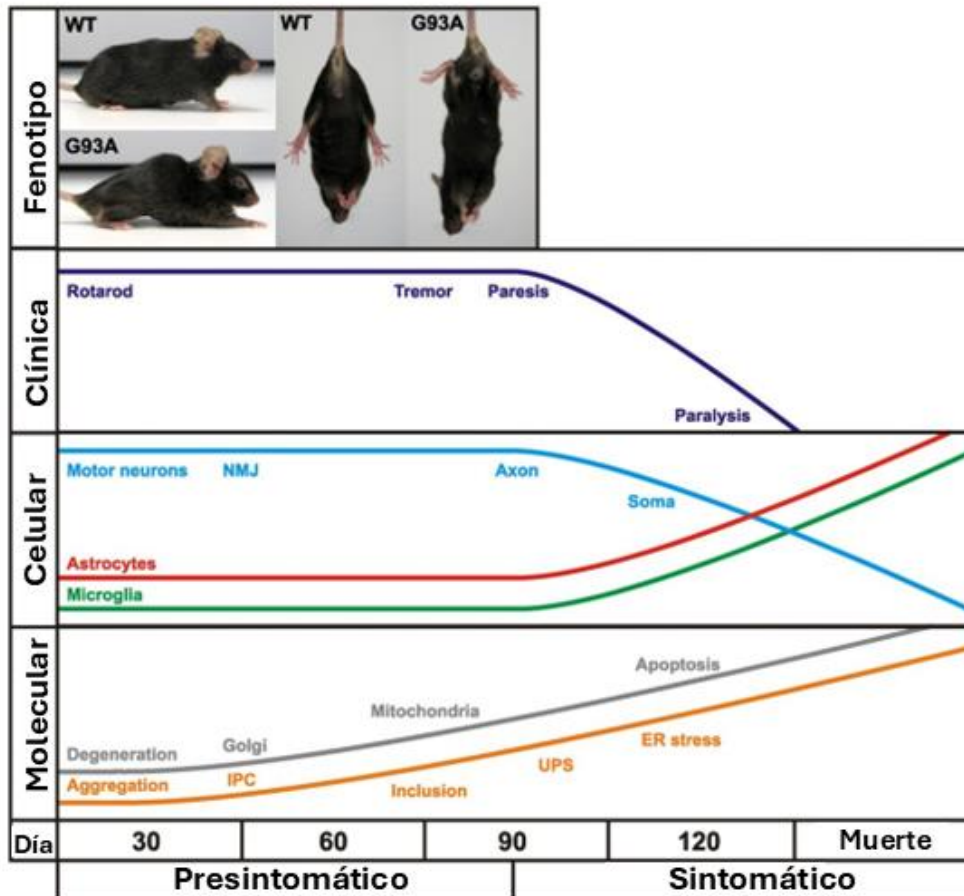


Figura 13. Evolución temporal de los eventos clínicos y neuropatológicos en ratones transgénicos $hSOD1^{G93A}$. Los ratones desarrollan temblor en las extremidades posteriores, debilidad y déficits locomotores alrededor de los 3 meses de edad, precedidos por una degeneración sináptica y axonal distal. Esta situación progresa hacia una parálisis fatal aproximadamente un mes después, acompañada de pérdida de motoneuronas espinales y gliosis reactiva. Adaptado de Turner BJ et al., 2008⁷⁷.

2 Metabolismo lipídico en el Sistema Nervioso Central

Los lípidos constituyen un grupo diverso y heterogéneo de biomoléculas orgánicas formadas por carbono, hidrógeno y oxígeno, pudiendo contener nitrógeno, fósforo y azufre. La propiedad común que comparten es que son insolubles en agua y solubles en disolventes orgánicos. Estas biomoléculas actúan como reserva energética, como sustratos metabólicos, forman parte integral de la estructura de las membranas celulares y participan activamente en la regulación de múltiples vías de señalización celular⁷⁸.

El sistema nervioso central (SNC) de los mamíferos presenta una elevada concentración de lípidos, que representan al menos el 50 % de su peso seco. Esta proporción supera a la encontrada en órganos metabólicamente activos como el hígado o el corazón⁷⁹. En el contexto del SNC, diversas clases lipídicas cumplen funciones fundamentales a nivel estructural, funcional, protector y metabólico, siendo claves para el mantenimiento de la fisiología tanto neuronal como glial⁷⁹⁻⁸¹. A escala subcelular, los lípidos son indispensables para conservar la integridad y funcionalidad de las membranas celulares, participar en la regulación de rutas de señalización, mantener la actividad de los orgánulos y organizar microdominios lipídicos especializados (como las balsas lipídicas) que facilitan la transducción de señales y la comunicación celular^{82,83}. En el plano celular, intervienen en el almacenamiento y uso energético, en la formación y estabilidad de la vaina de mielina, y en procesos como la neurogénesis, la oligodendrogénesis y la protección frente al daño⁸⁴⁻⁸⁶. A nivel tisular, resultan esenciales para la formación de sinapsis, la comunicación eficaz entre neuronas y la integridad de la barrera hematoencefálica^{79,80}. Finalmente, en el conjunto del órgano, los lípidos participan activamente en el desarrollo cerebral, el funcionamiento cognitivo y la modulación de la neuroinflamación y los mecanismos de reparación. Por todo ello, no resulta sorprendente que las alteraciones en el metabolismo lipídico se asocien cada vez más con disfunciones celulares y fenómenos neurodegenerativos en el SNC⁸⁷.

En los siguientes apartados, se revisarán los aspectos más relevantes de tres rutas clave del metabolismo lipídico que serán recurrentemente mencionadas a lo largo del presente trabajo: el metabolismo de los esfingolípidos, de los eicosanoides y el colesterol, y como las distintas rutas lipídicas impactan en el correcto funcionamiento del SNC.

2.1 Metabolismo de esfingolípidos

Los esfingolípidos son una clase compleja de lípidos bioactivos que, además de formar parte esencial de las membranas celulares, participan en múltiples procesos de señalización implicados en la proliferación celular, la diferenciación, la respuesta al estrés, la inflamación y la muerte celular. A diferencia de otros lípidos de membrana, los esfingolípidos tienen como base estructural un aminoalcohol de cadena larga denominado esfingosina, que puede ser modificado mediante diversas reacciones enzimáticas para dar lugar a una amplia variedad de moléculas funcionales. El metabolito central de esta familia es la ceramida, una molécula formada por la unión de esfingosina con un ácido graso mediante un enlace amida. La ceramida se considera una “molécula pivote” dentro del metabolismo esfingolípido, ya que constituye el núcleo estructural del que derivan múltiples subrutinas metabólicas (Figura I4):

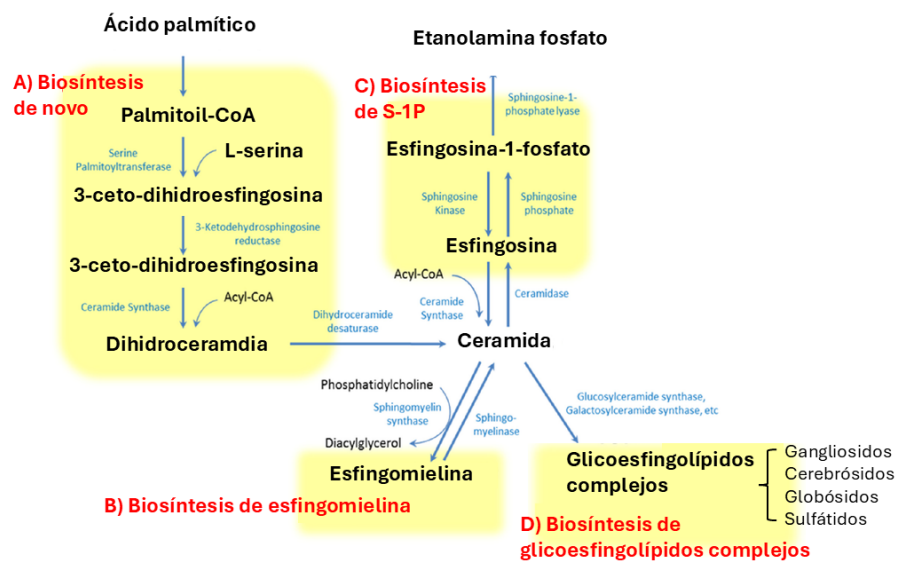


Figura I4. Rutas del metabolismo de esfingolípidos. El metabolismo de esfingolípidos tiene como molécula central la ceramida y de ella se derivan principalmente cuatro rutas: A) Biosíntesis de novo de ceramidas; B) Biosíntesis de esfingomielina; C) Biosíntesis de la esfingosina-1-fosfato; D) Biosíntesis de glicoesfingolípidos complejos. Adaptado de Castillo RI et al., 2016⁸⁸.

Biosíntesis de novo de ceramidas: es el principal mecanismo por el cual las células generan ceramidas en condiciones basales, y tiene lugar predominantemente en el retículo endoplasmático. Esta ruta se inicia con la condensación de Serina y Palmitoil-CoA. La ceramida además de actuar como molécula señalizadora, es el precursor de la esfingomielina, de la esfingosina-1-fosfato y de los glucoesfingolípidos⁸⁹.

Esfingomielina: este esfingolípido está compuesto de una molécula de ceramida unida a un grupo fosfocolina o fosfoetanolamina. La síntesis se da en el aparato de Golgi y las enzimas que catalizan este proceso son las esfingomielinas sintetasas (SMGS). Esta molécula es uno de los componentes estructurales más abundantes de las membranas plasmáticas, especialmente en las células del sistema nervioso, donde se concentra en la vaina de mielina que recubre los axones⁹⁰.

Esfingosina-1-fosfato (S1P): Las ceramidas se pueden catabolizar a esfingosinas por la acción de las ceramidasa y estas esfingosinas a su vez pueden fosforilarse por la acción de las esfingosinas quinasas (SPKH) para dar lugar a la esfingosina-1-fosfato (S1P). Aunque es un metabolito pequeño, la S1P actúa como una potente molécula señalizadora. Tiene funciones tanto en la señalización extracelular, donde regula procesos inmunológicos como la infiltración linfocitaria y procesos vasculares como la angiogénesis, como funciones de segundo mensajero intracelular donde promueve la proliferación y supervivencia celular⁹¹.

Glucoesfingolípidos: Se caracterizan por presentar un esqueleto lipídico de ceramida al que se une, mediante un enlace glicosídico, uno o varios azúcares. Según la naturaleza y longitud de la cadena glucídica, se distinguen distintos tipos de glucoesfingolípidos, entre los cuales los cerebrósidos y los gangliósidos son especialmente relevantes en el sistema nervioso. Los cerebrósidos son glucoesfingolípidos simples, constituidos por la unión de la ceramida con un único monosacárido. Cuando este azúcar es una galactosa, se forma la galactosilceramida, un componente esencial de las vainas de mielina. Por otro lado, los gangliósidos representan formas más complejas, al estar compuestos por una ceramida unida a una cadena de azúcares que incluye uno o más residuos de ácido siálico. Estos lípidos se localizan en la superficie externa de la membrana plasmática, donde la ceramida se inserta en la bicapa lipídica, y los oligosacáridos se exponen al medio extracelular. Esta disposición los convierte en puntos clave de interacción con otras moléculas, participando en procesos como el reconocimiento celular y la comunicación entre células. Los gangliósidos son particularmente abundantes en el sistema nervioso, donde llegan a representar aproximadamente el 6 % del contenido lipídico total, y actúan como marcadores de superficie que median funciones específicas en el desarrollo y mantenimiento neuronal⁹².

Alteraciones genéticas en las enzimas implicadas en el metabolismo de esfingolípidos provocan la acumulación tóxica de metabolitos y el deterioro progresivo de las funciones neuronales. Ejemplos clásicos de esta relación son las esfingolipidosis como la enfermedad de Tay–Sachs y la de Sandhoff, causadas por mutaciones en *HEXA* y *HEXB*, respectivamente, que impiden la degradación del gangliósido GM2; la enfermedad de Gaucher, debida a variantes patogénicas en *GBA1* que afectan a la glucocerebrosidasa; o la enfermedad de Niemann–Pick, asociada a mutaciones en *SMPD1* o en *NPC1/NPC2*, que alteran la degradación de la esfingomiélinina o el transporte lisosomal de colesterol y esfingolípidos. Todas ellas comparten una marcada afectación neurológica —que incluye degeneración neuronal, desmielinización y deterioro cognitivo y motor— subrayando la importancia crítica de las rutas del metabolismo de esfingolípidos para el correcto funcionamiento del SNC⁹³.

2.2 Metabolismo de eicosanoides

Los eicosanoides son lípidos señalizadores que provienen de la oxidación de ácidos grasos de veinte carbonos, siendo el principal precursor el ácido araquidónico. Su principal función es mediar eventos de inflamación y respuesta inmune, aunque también tiene funciones secundarias regulando procesos relacionados con el sueño y la memoria⁹⁴. En el sistema nervioso central son clave en modular los procesos neuroinflamatorios cuando el tejido sufre algún daño (traumatismo, isquemia, infección viral o bacteriana, cáncer o enfermedades neurodegenerativas). La respuesta inflamatoria comienza con la migración de la microglía y leucocitos a la zona dañada⁹⁵. Estos liberan citoquinas y quimioquinas que promueven la activación de la fosfolipasa Pla2g15 que sintetizan ácido araquidónico (AA) a partir de fosfolípidos de membrana. A partir de aquí el AA puede seguir principalmente dos rutas enzimáticas (Figura I5):

- Ruta de las Ciclooxygenasas: que generan prostaglandinas y tromboxanos por las enzimas COX (en ratón los genes de estas enzimas se nombran como *Acox*). Las prostaglandinas intervienen en la respuesta inflamatoria vasodilatando el tejido para permitir el paso de los leucocitos. Además, participan en la generación de la fiebre o el dolor. Los tromboxanos son clave en los procesos de agregación plaquetaria y coagulación y tienen efectos vasoconstrictores⁹⁶.

-Ruta de la Lipooxigenasa: que generan leucotrienos y lipoxinas por las enzimas LOX (en ratón los genes de estas enzimas se nombran como *Alox*). Los leucotrienos median reacciones de quimiotaxis para la infiltración de leucocitos, facilitan la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y potencian la producción de citoquinas⁹⁷. Por el contrario, las lipoxinas tienen efectos antiinflamatorios que buscan resolver la respuesta inflamatoria iniciada por los otros eicosanoides ⁹⁸. Esto es crítico ya que una respuesta inflamatoria mantenida en el tiempo tiene efectos dañinos para el sistema nervioso central.

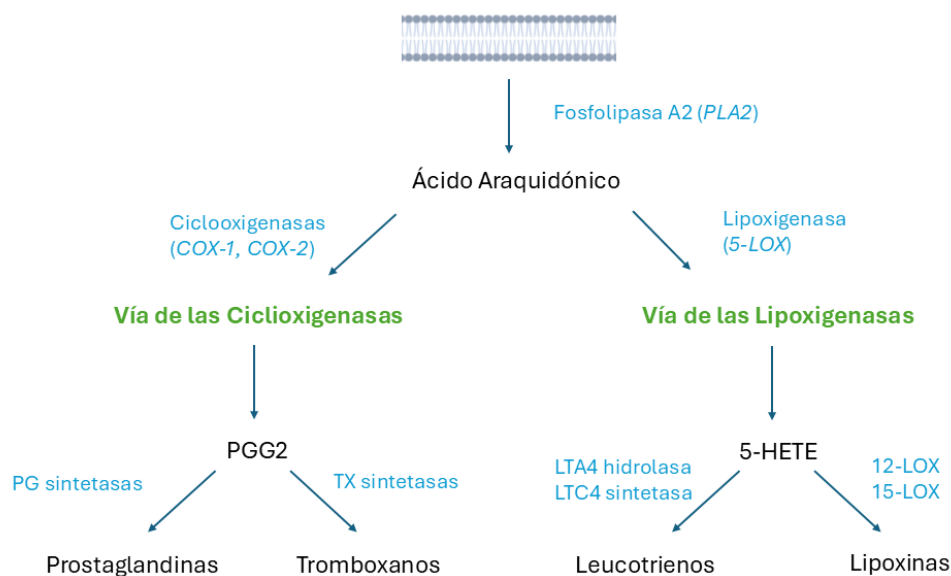


Figura I5. Rutas del metabolismo de eicosanoides. El metabolismo de esfingolípidos tiene como molécula precursora el ácido araquidónico y de ella se derivan principalmente dos rutas para la biosíntesis de eicosanoides: A) Vía de las ciclooxygenasas para producir prostaglandinas y tromboxanos; B) Vía de las lipooxigenasas para producir leucotrienos y lipoxinas.

2.3 Metabolismo del colesterol

El sistema nervioso central (SNC), a pesar de representar aproximadamente un 2% del peso corporal total, contiene cerca del 25% del colesterol total del cuerpo. Se estima que un 75% del colesterol en el SNC se encuentra en la mielina, mientras que el 25% restante está distribuido en los orgánulos y en las membranas plasmáticas de neuronas y células gliales⁹⁹. Aunque la mielina es una prolongación continua de la membrana plasmática, presenta una composición lipídica y proteica distintiva, acorde con sus funciones especializadas. En concreto, la mielina tiene un contenido lipídico mucho mayor (70–75%) que la membrana plasmática convencional (alrededor del 30–50%), y el colesterol representa entre un 25 y un 30% de los lípidos totales presentes en esta estructura¹⁰⁰.

Más allá de su papel en la mielinización, el colesterol participa activamente en procesos neuronales fundamentales como la formación de sinapsis, la transmisión neuronal y la plasticidad. Su función estructural es esencial, ya que proporciona la curvatura necesaria de la bicapa lipídica que permite la fusión y escisión de vesículas sinápticas, base del proceso de neurotransmisión. Por ello, no sorprende que las membranas presinápticas y postsinápticas estén especialmente enriquecidas en colesterol¹⁰¹. Además, el colesterol contribuye a la organización funcional de la membrana mediante la formación de microdominios conocidos como balsas lipídicas. Estas regiones dinámicas, ricas en colesterol, adquieren propiedades biofísicas particulares y actúan regulando la inclusión o exclusión selectiva de proteínas implicadas en rutas celulares específicas¹⁰².

Todas estas funciones ponen de manifiesto la importancia del metabolismo del colesterol para el mantenimiento de la función cerebral. La pérdida del control sobre estas rutas altamente reguladas conduce a alteraciones funcionales en el sistema nervioso central y periférico, favoreciendo la aparición de procesos neurodegenerativos y sus enfermedades asociadas. Para mantener la homeostasis del colesterol tres principales rutas son usadas: biosíntesis, transporte (exportación/importación) y procesamiento. La síntesis de novo y la importación mediante receptores de lipoproteínas permiten aumentar las reservas intracelulares, mientras que los mecanismos de exportación y procesamiento contribuyen a reducirlas. Estas rutas están finamente reguladas por un sistema de retroalimentación cuyo regulador central es el factor de transcripción SREBP2 (sterol-regulated element-binding protein 2)¹⁰³. Cuando el colesterol celular se acumula en exceso, la actividad de este factor se reprime, disminuyendo tanto la síntesis como la captación. Una vez en la célula, el colesterol se distribuye a distintos compartimentos por tráfico vesicular y no vesicular¹⁰⁴. El exceso puede almacenarse tras ser esterificado en forma de ésteres de colesterol dentro de gotas

lipídicas, o bien oxidarse para generar oxisteroles que posteriormente se eliminan al exterior.

Mantener unos niveles adecuados de colesterol es esencial para la salud del organismo. Se han descrito más de una docena de enfermedades metabólicas congénitas asociadas a mutaciones en genes implicados en las rutas de síntesis y procesamiento del colesterol^{105,106} (Figura I6). Por otro lado, concentraciones elevadas en sangre favorecen el desarrollo de aterosclerosis y aumentan el riesgo de patologías cardiovasculares. La relevancia del metabolismo del colesterol en el sistema nervioso central queda patente en el hecho de que alteraciones en enzimas clave de su biosíntesis o de su almacenamiento generan trastornos neurológicos graves. Ejemplo de ello son el síndrome de Smith-Lemli-Opitz (mutaciones recesivas en el gen *DHCR7* que impiden la conversión de 7-dehidrocolesterol en colesterol) y la enfermedad de Niemann-Pick tipo C (mutaciones recesivas en *NPC1* o *NPC2* que provocan acumulación lisosomal de colesterol). Además, se ha observado de manera consistente que una desregulación del metabolismo del colesterol está vinculada a enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, Párkinson, Huntington, la ELA o la demencia frontotemporal^{107,108}.

2.3.1 Biosíntesis de colesterol

La barrera hematoencefálica está formada por células endoteliales que están conectadas por uniones estrechas que constituye una barrera física que impide la entrada de colesterol circulante al sistema nervioso central (SNC). Por este motivo, el SNC depende casi por completo de su capacidad endógena para sintetizar, transportar, reciclar y almacenar colesterol¹⁰⁹.

Durante la etapa adulta la tasa de síntesis es muy reducida en neuronas y oligodendrocitos. Estos tipos celulares solo contribuyen de forma activa a la síntesis de colesterol durante la embriogénesis y durante el periodo postnatal cuando el proceso de mielinización requiere elevadas cantidades de colesterol. Por tanto, en el cerebro adulto son los astrocitos las principales células encargadas de sintetizar colesterol actuando como fuente de suministro para neuronas y oligodendrocitos¹⁰⁰. Tras la mielinización, el metabolismo del colesterol en el cerebro adulto se caracteriza por una tasa de recambio muy baja y pérdidas mínimas. La vida media del colesterol cerebral en el organismo adulto se sitúa entre 6 meses y 5 años, mientras que, en contraste, la vida media del colesterol plasmático es de apenas unos días^{110,111}.

Esta ruta de biosíntesis es un proceso complejo que implica más de veinte enzimas distintas. De manera resumida esta ruta implica los siguientes pasos: la síntesis de colesterol se inicia a partir de acetil-CoA, que se condensa para formar HMG-CoA gracias a la acción de ACAT2 y HMGCS1. Este intermediario es reducido por la HMG-CoA reductasa (HMGCR), enzima clave y paso limitante de la ruta, dando lugar a mevalonato. Posteriormente, una serie de reacciones catalizadas por enzimas como MVK y MVD transforman el mevalonato en unidades de cinco carbonos como isopentenil pirofosfato (IPP). Estas unidades se condensan para formar farnesil pirofosfato (FPP) mediante la acción de enzimas como la FDPS e IDI1, y a partir de este se genera escualeno gracias a FDFT1. El escualeno es convertido en lanosterol por la acción de SQLE y LSS. A partir de este punto, la ruta puede avanzar mediante dos itinerarios principales: la vía de Bloch y la vía de Kandutsch–Russell. En ambos casos, el lanosterol experimenta una serie de reacciones de desmetilación, reducción e isomerización que van transformando progresivamente la molécula hasta llegar al colesterol. La diferencia fundamental entre las dos rutas es el orden en que ocurren las reacciones de reducción del doble enlace en la posición Δ^{24} de la cadena lateral. Algunas de las enzimas implicadas en estos pasos finales son *CYP51*, *LBR*, *NSDHL*, *EBP*, *DHCR7* y *DHCR24* (Figura I6).

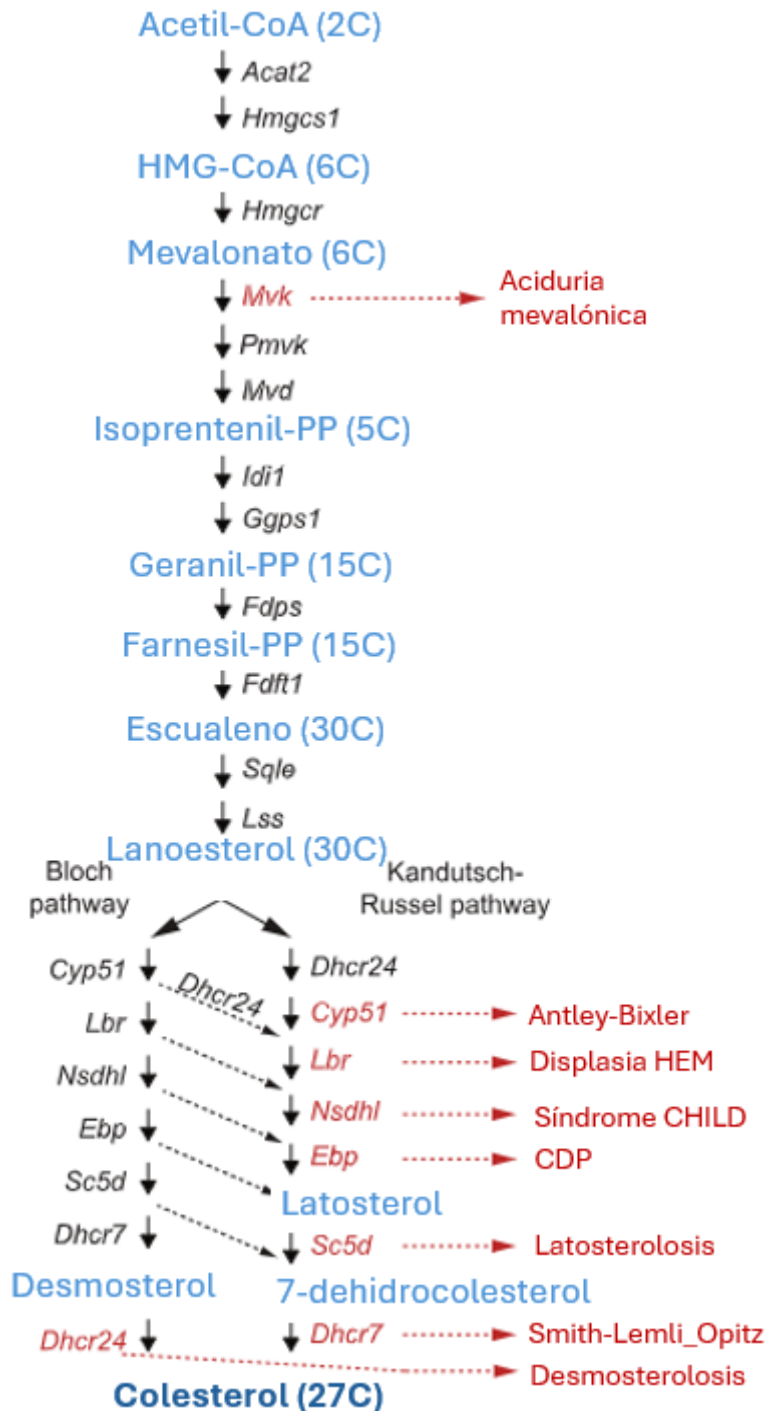


Figura I6. Ruta enzimática de la biosíntesis de colesterol. En azul los metabolitos generados a lo largo de la ruta, en negro los genes que codifican para las enzimas implicadas en este proceso y en rojo los genes que tienen descritos mutaciones asociadas a patologías.

Debido a las numerosas funciones esenciales que desempeña el colesterol en el SNC, su síntesis está estrechamente regulada. El principal regulador transcripcional de esta vía es el factor SREBP2 (Sterol Regulatory Element-Binding Protein 2) codificado por el gen *SREBF2*. En condiciones basales, SREBP2

permanece anclado a la membrana del retículo endoplasmático (RE), formando un complejo inactivo con SCAP (SREBP Cleavage-Activating Protein) e INSIG (Insulin Induced Gene). SCAP tiene un dominio de unión a colesterol que le permite actuar como sensor del colesterol intracelular. Cuando la concentración de colesterol es baja, el colesterol se disocia de SCAP y esto provoca un cambio conformacional en SCAP que conlleva que ya no esté unido a INSIG, permitiendo que el complejo SREBP2–SCAP sea transportado desde el RE hasta el aparato de Golgi. Una vez allí, SREBP2 es procesado por dos proteasas, S1P y S2P, liberando el fragmento N-terminal que corresponde a la forma activa de SREBP2. Esta forma madura, que contiene el dominio de unión al ADN tipo bHLH (basic-helix-loop-helix), se transloca al núcleo, donde se une a regiones denominadas SREs (Sterol Regulatory Elements) en los promotores de genes diana. Entre los genes regulados directamente por SREBP2 se incluyen *HMGCR* (que codifica la HMG-CoA reductasa, enzima limitante de la vía), *HMGCS1*, *MVK*, *FDPS*, *SQLE*, *LSS* y *LDLR*, todos ellos fundamentales para la biosíntesis de colesterol y la captación de lipoproteínas¹⁰³(Figura 17).

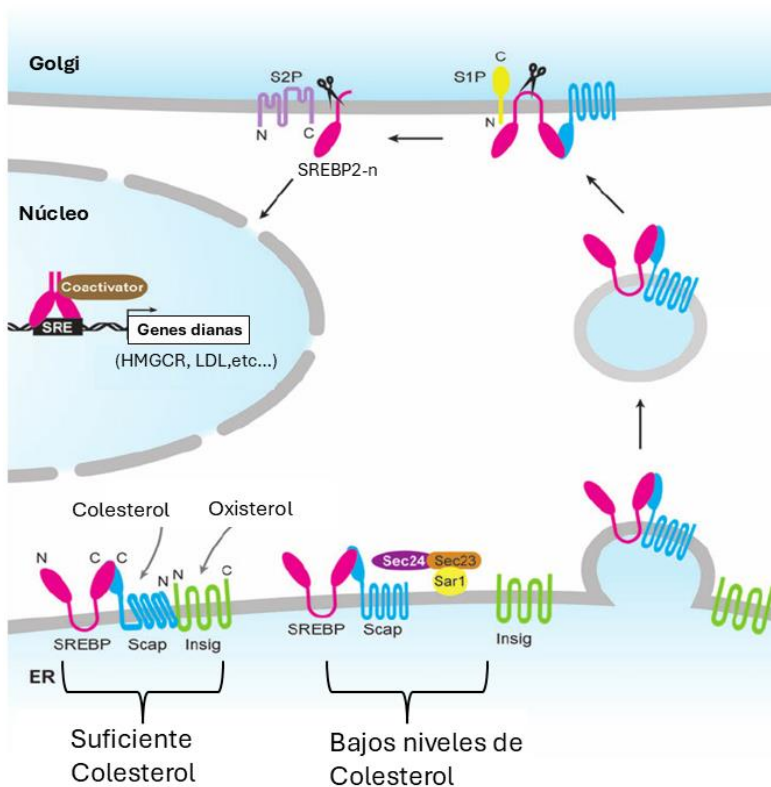


Figura 17. Regulación del metabolismo del colesterol ejercida por SREBP2. Esquema de los mecanismos moleculares que permiten que SREBP2 regule la expresión de genes clave en la biosíntesis y captación de colesterol. Adaptado de Espenshade PJ et al., 2007¹¹².

2.3.2 Transporte de colesterol

Las lipoproteínas son partículas complejas formadas por un núcleo hidrofóbico compuesto de lípidos no polares, rodeado por una capa hidrofílica que incluye fosfolípidos, colesterol libre y apolipoproteínas. En la periferia, las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y de baja densidad (LDL) facilitan la distribución de colesterol y otros lípidos sintetizados en el hígado hacia distintos órganos. Por el contrario, las lipoproteínas de alta densidad (HDL) actúan como transportadores inversos, movilizándolo desde los tejidos periféricos de vuelta al hígado.

Dentro del SNC, el sistema de transporte del colesterol funciona de forma independiente a la circulación periférica. En este contexto, ApoE es la principal proteína transportadora de colesterol, y se expresa mayoritariamente en los astrocitos, seguidos por los oligodendrocitos y la microglía. Las neuronas, en condiciones normales, expresan niveles bajos de ApoE, aunque pueden inducir su expresión en situaciones de estrés o daño¹¹³. La exportación de colesterol está mediado por transportadores de la familia ABC (*ATP-binding cassette*), que transfieren colesterol a apolipoproteínas como ApoE, en la membrana plasmática. Entre estos transportadores, ABCA1 y ABCG1 son los más abundantemente expresados en el sistema nervioso central. Una vez exportado el colesterol al medio extracelular en forma de lipoproteína los otros tipos celulares captan el colesterol a través de receptores específicos de lipoproteínas pertenecientes a la familia de los receptores de LDL, siendo LDLR y LRP1 los más implicados en el transporte mediado por ApoE¹¹⁴. Estos receptores reconocen e internalizan ApoE en su conformación activa, es decir, cuando se encuentra unido a lípidos¹¹⁵. Una vez internalizados, los complejos lipoproteicos son hidrolizados, liberando colesterol libre para su utilización intracelular.

2.3.3 Procesamiento del colesterol

Dado que el colesterol no puede degradarse directamente, su exceso se convierte en oxisteroles o ésteres de colesterol cuando su concentración intracelular aumenta demasiado (Figura I8). Los oxisteroles son derivados oxidados del colesterol generados por la acción de distintas hidroxilasas de esteroides. Un aspecto clave es que estos compuestos pueden atravesar la barrera hematoencefálica, lo que permite su eliminación desde el sistema nervioso central hacia la circulación sistémica.

La vía principal de eliminación del colesterol cerebral consiste en su conversión a 24-hidroxicolesterol (24-OHC) por la enzima CYP46A1. Existen además rutas secundarias, como la mediada por la 25-hidroxisilasa de esteroides (CH25H), que produce 25-hidroxicolesterol (25-OHC), o la 27-hidroxisilasa de esteroides (CYP27A1), que genera 27-hidroxicolesterol (27-OHC)^{116,117}. Más allá de su papel en la eliminación del colesterol, los oxisteroides actúan también como moléculas señalizadoras de gran relevancia. Muchos de ellos se unen a los receptores nucleares LXR (Liver X Receptors), activando la expresión de genes implicados en la homeostasis intracelular del colesterol¹¹⁸. Esta vía de señalización será explicada en detalle en el siguiente subapartado de la introducción.

Otra vía fundamental para regular los niveles intracelulares de colesterol consiste en su conversión a ésteres de colesterol. Estos ésteres se almacenan en gotas lipídicas citoplasmáticas, estructuras que también contienen otros lípidos neutros como triglicéridos y ácidos grasos. Estas gotas actúan como reservas energéticas o como fuente de componentes estructurales de membranas, especialmente en situaciones de alta demanda metabólica¹¹⁹. La enzima responsable de esta conversión es la esterol O-aciltransferasa (SOAT) y en el SNC en concreto la esterificación es realizada por la isoforma SOAT1 que es la que se expresa de manera ubicua.

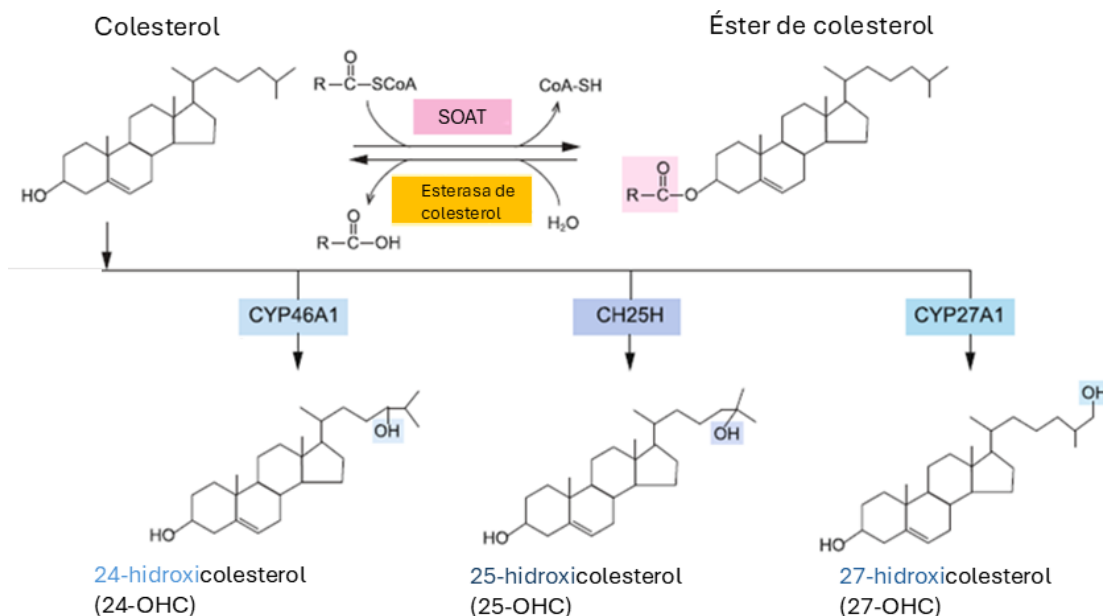


Figura 18. Procesamiento del colesterol hacia ésteres de colesterol y diversas formas de oxisteroides. Se destacan las principales enzimas y pasos implicados en el procesamiento del colesterol para generar ésteres de colesterol y diferentes formas de oxisteroides. SOAT: acil-coenzima A:colesterol aciltransferasa; CYP46A1: esterol 24-hidroxisilasa; CH25H: esterol 25-hidroxisilasa; CYP27A1: esterol 27-hidroxisilasa. Adaptado de Ho WY et al., 2022¹²⁰

2.3.4 Regulación de la homeostasis del colesterol mediante la vía de señalización de los LXR

Cuando los niveles intracelulares de colesterol son bajos se activa transcripcionalmente los genes involucrados en la biosíntesis mediante la actuación de SREBP2 como ha sido descrito en el subapartado 2.3.1 *Biosíntesis del colesterol*. Sin embargo, cuando los niveles intracelulares de colesterol se elevan demasiado, se activa otro regulador transcripcional clave: los receptores nucleares LXR (Liver X Receptors), que inducen la expresión de genes implicados en la exportación del colesterol y reprimen su captación¹²¹ (Figura I9).

Existen dos isoformas de LXR, codificadas por los genes *NR1H3* y *NR1H2*, que corresponden a LXRA y LXRb, respectivamente. En ausencia de ligando, los LXRs forman heterodímeros obligatorios con el receptor X de retinoides (RXR), uniéndose a elementos específicos en las regiones promotoras de sus genes diana. En este estado, el complejo LXR-RXR recluta correpresores, como NCoR (Nuclear receptor Co-Repressor) o SMRT (Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid hormone receptors), lo que mantiene a los genes en un estado de represión transcripcional¹²². La unión de ligandos específicos, como ciertos oxisteroles o desmosterol, provoca la liberación de estos correpresores y el posterior reclutamiento de coactivadores, como SRC-1 (Steroid Receptor Coactivator-1), CBP/p300 o PGC-1 α , activando así la transcripción génica¹²³. Este mecanismo se activa cuando el colesterol intracelular aumenta y es necesario exportarlo fuera de la célula. De esta manera aumenta la expresión de genes que codifican para los transportadores ABCA1 y ABCG1, así como la apolipoproteína E (ApoE)¹²¹. Además, los LXRs inducen la expresión de *IDOL* (*Inducible Degradar of LDLR*), una ligasa E3 de ubiquitina que marca al receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) para su degradación. Este mecanismo disminuye la captación de colesterol desde el exterior celular, añadiendo así una capa adicional de control sobre la homeostasis del colesterol¹²³.

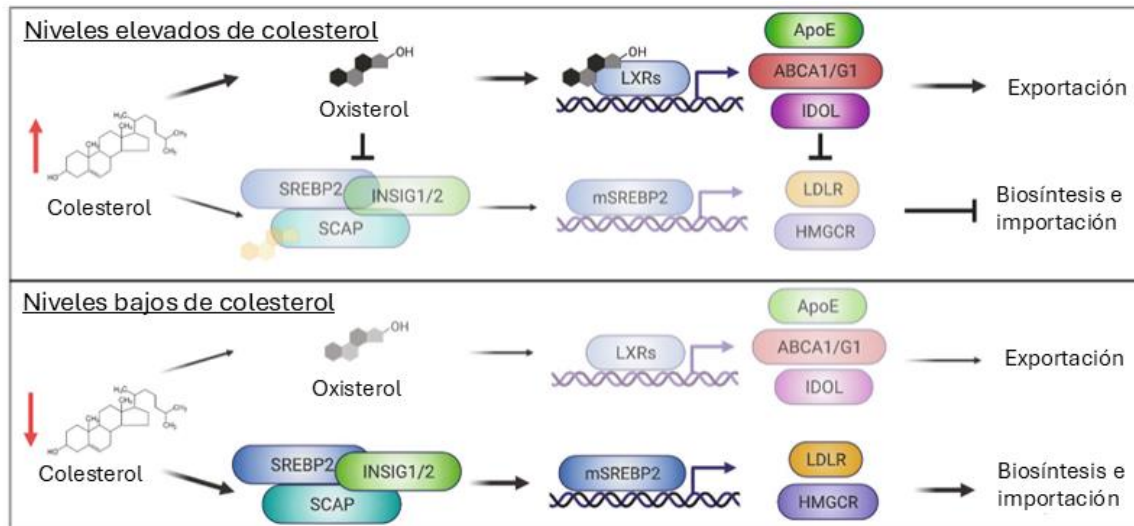


Figura I9. Esquema que muestra la interacción entre dos vías de regulación del colesterol: la señalización mediada por SREBP2 y por LXR. Adaptado de Hannelore Hartmann et al., 2022¹²⁴

3 Alteraciones del metabolismo lipídico en la ELA

Como se ha comentado anteriormente una correcta homeostasis lipídica es necesaria para funciones clave del SNC, por ello no es de extrañar que se hayan identificados alteraciones del metabolismo de lípidos en diversas enfermedades neurodegenerativas. En concreto en la ELA hay numerosos estudios que describen importantes desregulaciones lipídicas tanto a nivel del sistema nervioso central como a nivel sistémico. En los siguientes subapartados se describirán las principales alteraciones del metabolismo lipídico encontrados en estos tejidos y el resumen de estas están representadas en la Tabla I1 al final de esta sección.

3.1 Alteraciones lipídicas en la médula espinal de los pacientes de ELA

El estudio de alteraciones específicas en el metabolismo lipídico directamente en el tejido neuronal afectado ha proporcionado información muy valiosa. Sin embargo, estos estudios se basan en muestras post-mortem, por lo que reflejan principalmente los cambios propios de las fases terminales de la enfermedad. En la médula espinal de pacientes con ELA se ha detectado una acumulación de ésteres de colesterol, con algunas especies que llegan a presentar incrementos de hasta 22 veces^{125,126}. De forma interesante, la HMG-CoA reductasa, enzima clave y

limitante en la biosíntesis de colesterol, se encuentra reducida en la sustancia gris de la médula espinal de estos pacientes¹²⁶. Además, los niveles de 24-hidroxicolesterol (24-OHC) se han descrito aumentados en tejido post-mortem¹²⁷.

En el perfil lipídico observado en la médula espinal de pacientes con ELA los niveles totales de triglicéridos (TG) están mayoritariamente reducidos, aunque se han descrito algunas especies concretas de TG que se encuentran triplicadas. Entre ellas destacan los TG que contienen el ácido graso saturado palmitato (C16:0) y aquellos con el ácido graso monoinsaturado oleico (C18:1n9)^{126,128}.

También se han documentado alteraciones en el metabolismo de los esfingolípidos, con un aumento de los niveles de esfingomielinas y ceramidas¹²⁵, en particular de especies como Cer 16:0, Cer 24:0 y SM 16:0. Del mismo modo, se ha observado una acumulación significativa de varios glicoesfingolípidos, incluidos los cerebrósidos galactosilceramida y glucosilceramida¹²⁹. Por último, algunas especies de fosfolípidos también se encuentran disminuidas, especialmente las fosfatidilcolinas y las fosfatidiletanolaminas¹³⁰.

3.2 Alteraciones lipídicas en líquido cefalorraquídeo de pacientes de ELA

El estudio del líquido cefalorraquídeo (LCR) se considera una herramienta que refleja de forma mucho más fiel las vías biológicas alteradas en la médula espinal degenerada en comparación con la sangre. Además, permite obtener datos en puntos temporales previos al punto final post-mortem que dan los tejidos de médula espinal. Sin embargo, debido a la naturaleza invasiva de la obtención de LCR, el número de estudios en este tejido son limitados. En un estudio lipídico que comparó el LCR de pacientes con ELA y controles para medir metabolitos relacionados con el colesterol, se observó un aumento en los niveles de colesterol, mientras que algunos de sus derivados mostraban niveles disminuidos¹³¹. Los niveles de oxiesteroles también se han descrito como alterados en varios estudios lipídicos, aunque los resultados son contradictorios, especialmente en lo que respecta al 24-hidroxicolesterol y al 25-hidroxicolesterol^{131,132}. Otro estudio que también comparó el LCR de pacientes y controles, pero enfocado en glicoesfingolípidos complejos reportó un aumento de las glucosilceramidas y del gangliósido GM1¹³³.

Hay pocos estudios que hayan realizado lipidómica no dirigida al LCR en la ELA, es decir, que hayan estudiado todas las especies lipídicas en vez de un panel de lípidos concretos. Los que si lo han hecho han identificado pocas especies con cambios significativos, pero destacan algunas como un descenso del monoglicérido 18:0 o un aumento de la fosfocolina 36:4¹³⁴.

3.3 Alteraciones lipídicas sistémicas en pacientes de ELA

Dado que se trata de un procedimiento no invasivo, la obtención de muestras de sangre de los pacientes representa una fuente ideal para la identificación de biomarcadores tempranos, además de posiblemente asistir en la estratificación de pacientes. No es sorprendente, por tanto, que muchos de los estudios metabolómicos en ELA se hayan centrado en el análisis de sangre. Una de las alteraciones más reportadas en estos trabajos es la hiperlipidemia presente en los pacientes. Entre los lípidos que con mayor frecuencia se encuentran elevados destacan el colesterol total, las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y los triglicéridos. De forma interesante, se ha observado que los niveles elevados de LDL y triglicéridos se asocian con una mayor supervivencia en pacientes con ELA¹³⁵⁻¹³⁸. Otro hallazgo consistente en los estudios es el aumento significativo de diversas especies de ésteres de colesterol y de ácidos grasos de cadena muy larga¹³⁹⁻¹⁴¹.

Por otro lado, los estudios lipidómicos han puesto de manifiesto importantes alteraciones en el metabolismo de los esfingolípidos. Muchos de estos trabajos, al analizar las rutas metabólicas en las que participan los lípidos más desregulados, identifican de forma recurrente procesos relacionados con el metabolismo de esfingolípidos^{134,141}. Varias especies de ceramidas, moléculas clave en esta vía, aparecen incrementadas en el plasma de los pacientes. Asimismo, se ha descrito un aumento de algunos glicoesfingolípidos complejos, como la lactosilceramida y el globósido GB3. En contraste, una de las observaciones más consistentes es el descenso progresivo de las esfingomielinas, que se agrava a medida que avanza la enfermedad¹³⁹.

Finalmente, otras rutas lipídicas que los estudios lipidómicos suelen identificar como alteradas están relacionadas con el metabolismo de los fosfolípidos. Se ha detectado un descenso significativo en varias clases de fosfolípidos, incluyendo la fosfatidilcolina (PC), la fosfatidilcolina éter (PCe), la fosfatidilserina (PS) y la fosfatidiletanolamina plasmalógeno (PEp). Entre todas las clases de glicerofosfolípidos, la PC y la PS parecen ser las más afectadas, mostrando una

disminución especialmente marcada y progresiva en el plasma de los pacientes con ELA en comparación con los controles¹⁴¹.

No obstante, las alteraciones del metabolismo lipídico en pacientes con ELA no se restringen a la sangre, sino que también se han descrito en otros órganos periféricos como el hígado y el músculo esquelético. En el hígado, se ha reportado que hasta un 76 % de los pacientes presentan esteatosis, acompañada de infiltración grasa en los hepatocitos y de cambios estructurales que apuntan a una disfunción metabólica incipiente^{135,142}. Por su parte, en el músculo esquelético las biopsias han revelado una acumulación anómala de colesterol en compartimentos lisosomales, junto con la sobreexpresión de los genes transportadores *NPC1* y *NPC2*, así como un incremento en la formación de gotas lipídicas¹⁴³. En conjunto, estas evidencias sugieren que la ELA no solo compromete al sistema nervioso, sino que también se asocia a alteraciones periféricas del metabolismo lipídico que podrían contribuir a la fisiopatología de la enfermedad.

Tejido	Alteraciones	
Médula espinal (post-mortem)	↑	Ésteres de colesterol, Ceramidas, 24-OHC, Esfingomielininas
	↓	Triglicéridos, Fosfatidilcolina, Fosfatidiletanolamina
LCR	↑	Glucosilceramidas, GM1, PC (36:4)
	↓	Colesterol, MG (18:0)
Sistémico (sangre)	↑	Colesterol total, LDL, Triglicéridos, Ácidos grasos de cadenas muy largas, Ésteres de colesterol, Ceramidas, GB3, Lactosilceramida
	↓	Esfingomielina, Fosfatidilcolina, Fosfatidilcolina éter, Fosfatidilserina, Fosfatidiletanolamina

Tabla 11. Resumen de las principales alteraciones lipídicas descritas en los pacientes de ELA en sangre, líquido cefalorraquídeo y médula espinal.

Hipótesis y Objetivos

Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

Las alteraciones en el metabolismo lipídico en pacientes con Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) son diversas y afectan a múltiples clases de lípidos, incluidos colesterol, ácidos grasos, fosfolípidos y esfingolípidos, entre otros. Estas alteraciones se han identificado tanto en el sistema nervioso central (médula espinal, líquido cefalorraquídeo) como a nivel sistémico (sangre, hígado, músculo). A pesar de la magnitud y diversidad de estas disrupciones metabólicas, su papel en la fisiopatología de la ELA ha sido tradicionalmente considerado secundario, principalmente por la limitación que presenta la poca accesibilidad del sistema nervioso de pacientes para estudiarlo in vivo, junto con la falta de herramientas que permitan ese estudio. Esta visión ha sido reforzada por la observación de alteraciones lipídicas similares en otras enfermedades neurodegenerativas en estadios avanzados.

En este trabajo se plantea la hipótesis de que algunas de estas numerosas alteraciones lipídicas podrían contribuir de manera significativa tanto a la susceptibilidad de desarrollar la ELA como a la modulación de su progresión, y que la desregulación de determinadas vías metabólicas lipídicas, presente ya en estadios presintomáticos, podría ser modulada para modificar el curso de la enfermedad. En este contexto, el metabolismo del colesterol emerge como un candidato clave, ya que sus alteraciones podrían constituir un evento temprano y compartido por distintas formas de ELA, incluida la esporádica, lo que abre la posibilidad de explorar estas vías como nuevas dianas terapéuticas en modelos preclínicos.

Objetivo 1

Identificar rutas y genes del metabolismo lipídico que se encuentren desregulados desde los estadios iniciales de la patología de la ELA usando el modelo murino hSOD1^{G93A}. Se plantearon los siguientes subobjetivos:

1.1: Analizar el transcriptoma lipídico de la médula espinal lumbar del ratón hSOD1^{G93A} en estadios iniciales.

1.2: Ampliar el estudio y la robustez de los resultados con un meta-análisis de transcriptomas de la médula espinal de modelos murinos de *SOD1* a

estadios tempranos (p90) y tardíos (>p120), que permita identificar y evaluar la progresión de rutas del metabolismo lipídico respecto a la progresión de la enfermedad.

1.3: Identificar y estudiar las alteraciones en la regulación de las principales vías del metabolismo de esfingolípidos, eicosanoides y colesterol en estadios tempranos y tardíos.

1.4: Validar *in-vivo* las alteraciones del metabolismo del colesterol identificadas en médula espinal, desde estadios presintomáticos hasta tardíos.

Objetivo 2

Evaluar la modulación del metabolismo del colesterol mediante el uso de agonistas farmacológicos de la vía de los LXR como potencial tratamiento, llevando a cabo un estudio preclínico en el modelo murino hSOD1^{G93A}. Se plantearon los siguientes subobjetivos:

2.1 Realizar un diseño experimental y una prueba piloto que permita estudiar la viabilidad y optimizar protocolos que permitan recoger el efecto de los agonistas de los LXR en la patología neuromuscular del modelo murino hSOD1^{G93A}

2.2 Evaluar el efecto del agonista T0 en la progresión de la enfermedad.

2.3 Analizar el impacto del agonista T0 en la capacidad locomotora.

2.4 Estudiar la influencia del agonista T0 en la supervivencia.

Objetivo 3

Estudiar las alteraciones del metabolismo del colesterol como un mecanismo fisiopatológico general de la ELA y no específico de mutaciones en *SOD1*. Se plantearon los siguientes subobjetivos:

3.1 Comparar el transcriptoma del metabolismo del colesterol en modelos murinos con mutaciones en los genes *SOD1*, *TDP-43* y *FUS*

3.2 Realizar un estudio de asociación causal de factores genéticos (*Mendelian Randomization*) para evaluar el papel causal de factores de riesgo lipídicos en el riesgo de sufrir ELA.

Materiales y Métodos

Materiales y Métodos

1 Animales

La cepa de ratón hSOD1^{G93A} [B6.Cg-Tg(SOD1-G93A)1Gur/J]⁶⁹ porta un alto número de copias (entorno a las 20 copias) del transgén humano *SOD1* con la mutación G93A en heterocigosis y fue obtenida de Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, EE. UU.). Se mantuvo en un fondo genético C57BL/6J (adquirido en Charles River) en el animalario del Hospital Clínico San Carlos. Para evitar la posible deriva genética cada 6 meses nuevos ratones C57BL/6J son introducidos en la colonia. El cruce para obtener ratones de experimento se realiza cruzando machos hSOD1^{G93A} con hembras *wild-type* de la colonia de C57BL/6J. La ventana de fertilidad de los machos hSOD1^{G93A} tiene un rango más pequeño de lo normal (entre la semana 7 y la 13 de manera aproximada). Aun así, es mejor opción que usar hembras hSOD1^{G93A} ya que tienen una fertilidad reducida y una capacidad reproductiva más limitada.

Los ratones fueron alojados en jaulas ventiladas individualmente, diseñadas para garantizar una circulación de aire óptima, las cuales se limpiaban y esterilizaban semanalmente. Tuvieron acceso ilimitado a alimento y agua, y se mantuvieron bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. Las condiciones ambientales se controlaron cuidadosamente, con una temperatura constante de 21 ± 2 °C y una humedad relativa de 55 ± 10 %. Los animales se agruparon por sexo, con un máximo de cinco individuos por jaula. El lecho de las jaulas consistía en virutas de madera de álamo autoclavadas, y se incluyeron fragmentos de cartón como material de enriquecimiento ambiental.

El bienestar y tratamiento de los animales se adhirieron a los principios éticos delineados en la Declaración de Helsinki. Todos los procedimientos que involucraron a los sujetos animales fueron aprobados por el Comité de Ética Institucional del Instituto de Investigación Biomédica del Hospital Clínico San Carlos, Madrid (C.I. 19/018-II, 26-11-2019), y obtuvieron la aprobación de la Dirección General de Agricultura, Ganadería y Alimentación de la Comunidad de Madrid, con los números de Proex 41.7/20 y 014.4/23. Los protocolos se llevaron a cabo con los estándares regulatorios definidos por las legislaciones europea y española, específicamente la Directiva 2010/63/EU y el RD 1201/2005.

1.1 Genotipado

A los 21 días los ratones son destetados, sexados y separados en jaulas. Para su identificación se utilizó el método de marcada de orejas. Estas mismas biopsias de oreja se utilizaron para realizar el genotipado mediante PCR. Tanto la a extracción de ADN como la PCR se realizó utilizando el Kit “Phire Tissue Direct PCR Master Mix” (ThermoFisher Scientific) siguiendo las pautas del fabricante. Para la amplificación de PCR convencional, se mezcló una dilución 1:10 de ADN total con los reactivos homogeneizados del kit y cebadores para amplificar tanto un control interno como el transgén humano *SOD1* (ver secuencia de cebadores utilizados en Tabla M1). Las condiciones de ciclado fueron: 3 minutos a 94°C seguidos de 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 55°C y 1 min a 72°C, seguido de una extensión final de 5 min a 72°C. Posteriormente se preparó una electroforesis en gel de agarosa al 2% con TBE 1X (ThermoFisher Scientific) y Midori Green (agente intercalante del ADN) (Nippon genetics) empleando un volumen de 15 µL de producto de PCR. Las condiciones de la electroforesis fueron 120 V durante 40 minutos. Se utilizó un marcador de peso molecular (Quick Load 100pb ADN Ladder, Roche) para proporcionar el tamaño de referencia del ADN. Para el revelado del gel se empleó el escáner de geles D-DiGit de LI-COR. El revelado de este gel permite genotipar de la siguiente forma: los ratones control sin transgen (“*wild-type*”) solo presentaban una banda superior a 324pb correspondiente al control interno, mientras que los ratones hemicígotos transgénicos h*SOD1*^{G93A} presentaban dos bandas, la correspondiente al control interno (324pb) y una banda de menor tamaño (236pb) correspondiente al transgén humano de *SOD1* (Figura M1). Para evitar posibles errores de genotipado, los ratones que habían sido utilizados en experimentos se les extraía una muestra de cola tras ser sacrificados para regenotiparlos.

Gen	<i>SOD1</i>	Control Interno (<i>Il-2</i>)
Cebador Forward	CATCAGCCCTAATCCATCTGA	CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT
Cebador Reverse	CGCGACTAACAATCAAAGTGA	GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC

Tabla M1. Lista de cebadores utilizados para el genotipado de ratones h*SOD1*^{G93A}

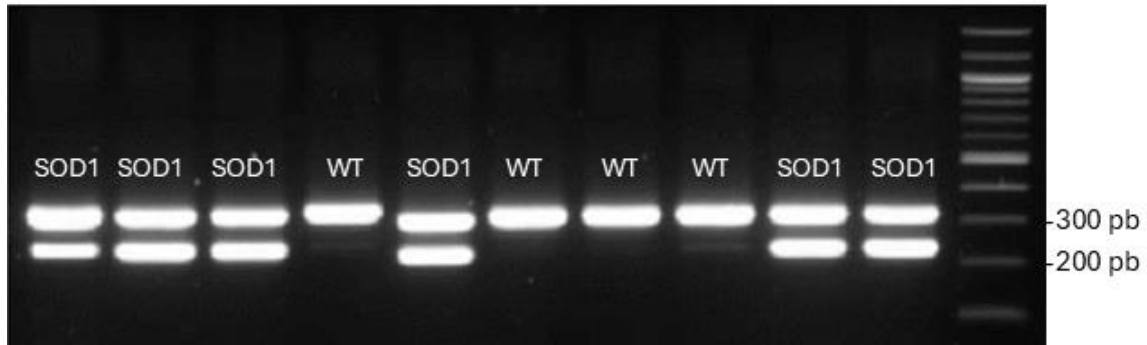


Figura M1. Ejemplo del escaneado de un genotipado de diez crías de un cruce $hSOD1^{G93A}$ (macho) X WT (hembra). La banda superior (324pb) corresponde al amplicón del control interno que indica el correcto funcionamiento de la PCR, mientras que la banda inferior (236pb) corresponde al amplicón del transgén humano con la mutación G93A. SOD1: ratones positivos para el transgén $hSOD1^{G93A}$; WT: ratones negativos para el transgén $hSOD1^{G93A}$

1.2 Análisis del número de copias del transgén $hSOD1^{G93A}$

Este modelo transgénico sufre de forma esporádica un fenómeno de inestabilidad genómica que le lleva a perder copias del transgén $hSOD1^{G93A}$. Para comprobar que el número de copias del transgén $hSOD1^{G93A}$ se mantuvo estable en la colonia, se analizó el conteo de copias mediante PCR cuantitativa (qPCR) de ADN. Este análisis se realizó en aquellos ratones con genotipo positivo para $hSOD1^{G93A}$ que fueron utilizados para los cruces o para los experimentos. Los genes analizados fueron el transgén humano *SOD1* y el gen *S16* como control interno. Para la extracción de ADN, se partió de una muestra de oreja o cola recogidas post-mortem. Se utilizó el kit “High Pure PCR Template Preparation Kit” (Roche), que permite aislar ADN de alta pureza mediante lavados y centrifugaciones en columnas.

A continuación, se realizó la qPCR, en donde cada pocillo contenía: 5 μ L de SYBR Green, 0,2 μ L de mezcla de cebadores forward y reverse a 18 μ M (ver la secuencia de cebadores en Tabla M2) y 5 μ L de muestra, diluida para obtener una cantidad total de 50 ng de ADN. Posteriormente, las muestras se cargaron en la placa y se programó el software Applied Biosystems 7500 para la qPCR, seleccionando el método “Quantitative-comparative”. Las condiciones de ciclado fueron: 1 ciclo de 20 segundos a 95 $^{\circ}$ C, seguido de 40 ciclos de 3 segundos a 95 $^{\circ}$ C y 30 segundos a 60 $^{\circ}$ C.

Gen	SOD1	S16
Cebador Forward	CAGCCCTAATCCATCTGATGCTT	TTCTGGGCAAGGAGCGATT
Cebador Reverse	AGACACATCGGCCACAGCAT	GATGGACTGTCGGATGGCA

Tabla M2. Lista de cebadores utilizados para realizar el análisis de copias del transgén hSOD1^{G93A}

Tras graficar la cuantificación relativa del transgén hSOD1^{G93A}, si algún individuo mostraba una pérdida del 20 % o más del transgén con respecto a los parentales que iniciaron la colonia, dicho individuo no se utilizaba para los cruces ni para los experimentos.

2 Análisis de RNA-seq

2.1 Extracción de ARN y secuenciación

Se aisló ARN de la región lumbar de la médula espinal diseccionada de ratonas hembra control (o *wild-type*) y hSOD1^{G93A} a los 90 días desde el nacimiento (p90). Tamaño muestral de 5 por grupo (n=5). El tejido fue homogenizado en 300 µL de QIAzol (Qiagen) para posteriormente aislar el ARN usando las instrucciones del kit “RNeasy Lipid Tissue Mini Kit” (Qiagen). El ARN utilizado para la secuenciación tenía un valor de RIN superior a 8,5 medido con el Bioanalyzer. Las muestras fueron enviadas a la empresa NIM Genetics (Madrid, España) para la secuenciación. El control de calidad de las muestras se realizó con TapeStation (Agilent Technologies), seguido de la cuantificación mediante el sistema fluorométrico Qubit (Thermo Fisher Scientific). Las bibliotecas de ADN complementario se prepararon usando TruSeq Stranded mRNA Library Prep y se secuenciaron en un equipo NovaSeq 6000 (ambos de Illumina, Inc.), produciendo lecturas *paired-end* de 100 pb.

2.2 Análisis Bioinformático de la secuenciación de ARN

Como resultado de la secuenciación, se obtuvieron los datos crudos en formato FastQ. Para el análisis bioinformático del estudio de secuenciación de ARN (RNA-seq), se siguió el siguiente pipeline:

- **Control de calidad:** La calidad de las lecturas contenidas en cada archivo FastQ fue evaluada con el programa *FastQC*

(<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Las lecturas de baja calidad (puntuación de calidad Phred < 30) y aquellas demasiado cortas (longitud < 30 pb) fueron eliminadas mediante *Fastp*¹⁴⁴. Cada muestra contenía entre 35 y 55 millones de lecturas.

- **Alineamiento al genoma de referencia:** Se realizó utilizando *HISAT2*¹⁴⁵, tomando como entrada los archivos FastQ filtrados por *Fastp* y empleando como genoma de referencia el ensamblado mm10. Este paso generó un archivo BAM por muestra, conteniendo los alineamientos. Todas las muestras presentaron un porcentaje de alineamiento al genoma mm10 superior al 85 %.
- **Cuantificación de la expresión génica:** Se llevó a cabo con *FeatureCounts*¹⁴⁶, a partir de los archivos BAM obtenidos del alineamiento y el archivo de anotaciones correspondiente al genoma mm10. Esto generó una matriz de conteo que indica cuántas lecturas se alinearon con cada gen por muestra.

Esta primera parte del análisis bioinformático se realizó utilizando el servidor en línea “Galaxy” (<https://usegalaxy.eu/>). El resto del análisis se llevó a cabo utilizando programación en R (versión 4.3.0), usando el software Rstudio (versión 2023.03.1):

- **Análisis de expresión génica diferencial:** Se realizó con el paquete *DESeq2*¹⁴⁷, utilizando como entrada la matriz de conteo generada por *FeatureCounts*. Los *p* valores crudos fueron ajustados mediante el método de corrección por comparaciones múltiples de Benjamini–Hochberg, considerando que un gen estaba significativamente desregulado cuando el *p* valor ajustado era menor a 0.05.
- **Volcano plots, análisis de componentes principales (PCA) y mapas de calor:** Fueron generados en R utilizando los paquetes *DESeq2*¹⁴⁷ y *pheatmap* (<https://CRAN.R-project.org/package=pheatmap>).
- **Análisis de enriquecimiento funcional de procesos biológicos:** Se empleó el método de Análisis de Sobre-representación (*Over-Representation Analysis*, ORA), el cual evalúa estadísticamente la fracción de genes de una determinada ruta funcional presentes en el conjunto de genes de interés. Para llevar a cabo este análisis, se utilizó la función *enrichGO* del paquete *clusterProfiler*¹⁴⁸. Los *p* valores se ajustaron utilizando el método de Benjamini–Hochberg, considerando significativo todo proceso biológico con un *p* valor ajustado menor a 0.05.
- **Identificación de genes relacionados con lípidos:** Para identificar genes asociados al metabolismo lipídico, se recopilaron todos aquellos genes anotados en el genoma bajo las categorías del Gene Ontology (GO) “*lipid*

metabolic process” (GO:0006629) y “*lipid transport*” (GO:0006869), obteniéndose un total de 1587 genes anotados como relacionados con lípidos.

- **Diagrama de Venn:** Para comparar la cantidad de genes diferencialmente expresados (DEGs) con la lista de genes lipídicos, se utilizó la función *venn.diagram* del paquete *VennDiagram* (<https://CRAN.R-project.org/package=VennDiagram>).

3 Meta-análisis de estudios de RNA-seq

Los conjuntos de datos transcriptómicos analizados en este estudio fueron descargados del repositorio público NCBI GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). La búsqueda se realizó utilizando los siguientes términos y sus combinaciones: “amyotrophic lateral sclerosis”, “RNA-seq”, “transcriptome”, “SOD1” y “mouse”. Para ser incluidos, los estudios debían cumplir con todos los siguientes criterios: (1) contener datos transcriptómicos obtenidos a partir de médula espinal de ratones con mutación en el gen *SOD1* y de sus respectivos controles, (2) haber sido generados mediante secuenciación *bulk RNA-seq* (secuenciar el ARN total de una muestra sin distinguir entre tipos celulares), y (3) provenir de muestras recolectadas en etapas sintomáticas tempranas (aproximadamente a los 90 días) y sintomáticas tardías (a partir de los 120 días). Con base en estos criterios, se incorporaron cinco estudios adicionales (estudios 2 a 6) junto con nuestro propio conjunto de datos (estudio 1) para llevar a cabo los meta-análisis. Un resumen de los estudios seleccionados se presenta en la Tabla M3.

Estudio	Identificador	Plataforma	Tejido	Edad	Tamaño muestral
Estudio 1	GSE184484 (Nuestro estudio)	Illumina NovaSeq 6000	Médula espinal de ratón (lumbar)	90 días	5 WT, 5 hSOD1 ^{G93A} (hembras)
Estudio 2	GSE43879	Illumina Genome Analyzer II	Médula espinal de ratón (región no especificada)	95 días	2 WT, 2 hSOD1 ^{G93A} (ambos)
Estudio 3	GSE106364	Illumina HiSeq 4000	Médula espinal de ratón (lumbar)	90 días	5 WT, 5 SOD1 ^{G86R} (hembras)
Estudio 4	GSE43879	Illumina Genome Analyzer II	Médula espinal de ratón (región no especificada)	120 días	2 WT, 2 hSOD1 ^{G93A} (ambos)
Estudio 5	GSE100888	Illumina HiSeq 2000	Médula espinal de ratón (lumbar)	150 días	4 WT, 4 hSOD1 ^{G93A} (ambos)
Estudio 6	GSE106803	Illumina HiSeq 2000	Médula espinal de ratón (región no especificada)	150 días	3 WT, 3 hSOD1 ^{G93A} (ambos)

Tabla M3. Resumen de las características de los estudios de RNA-seq seleccionados para el meta-análisis obtenidos de *Gene Expression Omnibus*.

Una vez descargados los archivos FastQ de cada estudio, estos fueron analizados siguiendo el mismo pipeline descrito en la Sección 2.2 *Análisis Bioinformático*. Los genes diferencialmente expresados (DEGs) obtenidos en cada estudio individual de RNA-seq fueron integrados posteriormente en un meta-análisis, con el objetivo de identificar con mayor potencia y robustez genes diferencialmente expresados en las etapas sintomáticas iniciales y tardías. Ambos meta-análisis se realizaron mediante el test de combinación de probabilidades de Fisher, utilizando R y el paquete *metaRNASeq*¹⁴⁹. Los *p* valores crudos fueron ajustados mediante el método de tasa de descubrimiento falso (FDR) de Benjamini–Hochberg, considerando estadísticamente significativos aquellos *p* valores ajustados menores a 0.01.

4 Visualización de redes de interacción proteína-proteína

Se construyó una red de interacción proteína–proteína utilizando la plataforma STRING¹⁵⁰, a partir de los DEGs lipídicos encontrados en los meta-análisis de las etapas sintomáticas temprana y tardía. Se seleccionaron los siguientes parámetros: tipo de red: “full STRING network”; puntuación de confianza requerida: alta (0.7); rigurosidad del FDR: media (5%).

5 Validación de la expresión génica por PCR cuantitativa

Se aisló ARN de la región lumbar de la médula espinal de ratonas *wild-type* y *hSOD1^{G93A}* a los 90 y 120 días de edad (n = 4–5 por grupo). El tejido fue homogenizado en 300 µL de QIAzol (Quiagen) para posteriormente aislar el ARN usando las instrucciones del kit “RNeasy Lipid Tissue Mini Kit” (Quiagen). El ARN extraído fue tratado con DNasa (Quiagen) para eliminar contaminación residual de ADN genómico. La síntesis de ADN complementario (ADNc) (retro-transcripción) se realizó con el kit “High Capacity cDNA Reverse Transcription” (Thermo Fisher Scientific) a partir de 1 µg de RNA, incluyendo una muestra control negativa sin la adición de la enzima retrotranscriptasa. Las reacciones de PCR en tiempo real se realizaron por triplicado utilizando 25 ng de cDNA y el reactivo “Fast SYBR Green Master Mix” (Thermo Fisher Scientific) en un equipo 7500 Fast Real-Time PCR System. Los cebadores se utilizaron a una concentración final de 180 nM. Estos fueron diseñados para generar amplicones que abarcaran más de un exón para evitar amplificación de DNA residual y cuyo amplicón tuviera un tamaño entre 90–140 pb. Otros cebadores se seleccionaron de bases de datos validadas para PCR cuantitativa (PrimerBank). Los cambios de expresión se calcularon mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ¹⁵¹, utilizando el software 7500 v2.0.6 y normalizando contra el gen de referencia endógeno *S16*. La lista de cebadores utilizados se puede ver en la tabla M4:

Gen	Cebador Forward	Cebador reverse
<i>S16</i>	TTCTGGGCAAGGAGCGATT	GATGGACTGTCCGATGGCA
<i>Acat2</i>	CCCGTGGTCATCGTCTCAG	GGACAGGGCACCATTGAAGG
<i>Hmgcr</i>	TCTGTTGTGAACCATGTGACTTC	AGCTTGCCCGAATTGTATGTG
<i>Mvk</i>	GGTGTGGTCCGAACTTCCC	CCTTGAGCGGGTTGGAGAC
<i>Sqle</i>	ATAAGAAATGCGGGGATGTCAC	ATATCCGAGAAGGCAGCGAAC
<i>Dhcr7</i>	AGGCTGGATCTCAAGGACAAT	GCCAGACTAGCATGGCCTG

<i>Dhcr24</i>	ACGGACGACGTAGAGCCCAG	CCACGTGGTGCTGCTCGTAC
<i>Srebf2</i>	GCGTTCTGGAGACCATGGA	ACAAAGTTGCTCTGAAAACAAATCA
<i>Abca1</i>	GTGACCTATGTGCTGCCGTA	GAGCCGGTCATCAATCTCAT
<i>Abcg1</i>	GTACCATGACATCGCTGGTG	AGCCGTAGATGGACAGGATG
<i>Apoe</i>	AACCGCTTCTGGGATTACCT	TGTGTGACCTTGGGAGCTCTG
<i>Lcat</i>	GTGGTCCATCAAGGCCATG	TGCCCTGGTTGTCACCTGA
<i>Idol</i>	ATGCTGTGCTATGTGACGAGG	TCGATGATCCCTAGACGCCTG
<i>Ldlr</i>	TGACTCAGACGAACAAGGCTG	ATCTAGGCAATCTCGGTCTCC
<i>Cyp46a1</i>	AGCCGCTATGAGCACATCC	CCATACTTCTTAGCCCAATCCAG
<i>Ch25h</i>	TGCTACAACGGTTCGGAGC	AGAAGCCCACGTAAGTGATGAT
<i>Cyp27a1</i>	CCAGGCACAGGAGAGTACG	GGGCAAGTGCAGCACATAG
<i>Soat1</i>	GAAGGCTCACTCATTGTGCGA	GTCTCGGTAATAAGTGTAGGCG
<i>Dgat1</i>	GCCTTACTGGTTGAGTCTATCAC	GCACCACAGGTTGACATCC
<i>Dgat2</i>	GCGCTACTTCCGAGACTACTT	GGGCCTTATGCCAGGAAACT
<i>Plin2</i>	GACCTTGTGTCCTCCGCTTAT	CAACCGCAATTTGTGGCTC
<i>Plin3</i>	TGCTATGGAGGAACCTGTTGTG	TCCCATACGTGGAAGTATAAGAG
<i>Atgl</i>	CAACGCCACTCACATCTACGG	GGACACCTCAATAATGTTGGCAC
<i>Sgpl1</i>	CTGAAGGACTTCGAGCCTATTT	ACTCCACGCAATGAGCTGC
<i>Hexb</i>	GCTGTTGGTGAGAGACTCTGGA	GAGGTTGTGCAGCTATTCCACG

Tabla M4. Lista de primers utilizados a lo largo de este trabajo para los experimentos de RT-qPCR. Todos los primers se han obtenido de artículos científicos o de *PrimerBank*. Se seleccionaron solo primers que generaran amplicones de un rango de 90-160pb y que cada uno de los primers hibridara en exones distintos para evitar la amplificación de DNA genómico.

6 Western-blot

La médula espinal se homogeneizó utilizando desagregación mecánica en un tubo con bolas de cerámica (Precells) en tampón RIPA (Thermo Fisher Scientific) a 4°C con un cóctel de inhibidores de proteasas (Roche) y fosfatasas (Roche). La clarificación del lisado se realizó con una centrifugación de 20 minutos a 13,000 g a 4°C. Se recolectó el sobrenadante y se cuantificó la cantidad total de proteína utilizando el método de ensayo DC (Bio-Rad). Para cada una de las muestras, se cargaron 30 µg de proteína en un gel prefabricado de acrilamida al 10% (Genescript) en condiciones reductoras y se corrieron a 130V durante 1 hora y media. Para la transferencia se usaron membranas de PVDF de baja autofluorescencia (GE Healthcare) y se realizó en condición “semi-húmeda” a 2,5V durante 30 minutos. Se utilizó un kit de detección de proteínas totales (LI-COR Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante para la corrección de la carga. Las membranas se bloquearon en PBS-Tween 0,1% con suero de leche al 5% durante media hora.

Después del bloqueo, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente (ver Tabla M5) a 4°C más de 12 horas, y tras los lavados con PBS-T, se incubaron durante dos horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente con fluoróforo en el espectro del infrarrojo (ver Tabla M5). La detección infrarroja se realizó en el escáner infrarrojo Clx (LI-COR Biosciences) que produce una imagen digital que puede ser cuantificada. La intensidad de las bandas se cuantificó utilizando el software de imagen Image Studio v.5.2 (LI-COR Biosciences).

Proteína marcada	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario
Srebp2	anti-Srebp2 Rabbit (Cayman) a 1:300	anti-Rabbit IR-800nm (Li-Cor) a 1:10000
Plin2	anti-ADFP Rabbit (Thermo) a 1:800	anti-Rabbit IR-680nm (Li-Cor) a 1:10000.

Tabla M5. Lista de anticuerpos utilizados para los experimentos de Western-blot.

7 Cultivos primarios de astrocitos

Se obtuvieron astrocitos primarios a partir de cortezas cerebrales de ratones recién nacidos (día postnatal p) p0-1. Las crías fueron sacrificadas por decapitación y las cortezas extraídas en condiciones estériles sobre una placa Petri en hielo bajo lupa estereoscópica. Las cortezas cerebrales fueron incubadas con una solución de tripsina al 0.25% (ThermoFisher) durante 20 minutos a 37 °C con agitación suave. Tras la digestión, el tejido fue neutralizado con medio DMEM completo que está compuesto de: medio DEMEM (Cultek) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Cultek), 1% penicilina/estreptomina (Thermo) y 1% L-glutamina (Thermo), que se filtra a través de un tamiz celular de 70 µm. Las células fueron centrifugadas a 1.500 rpm durante 5 minutos, resuspendidas en medio completo y sembradas en frascos de cultivo T25 pretratados con polilisina (10 µg/mL, Sigma-Aldrich), a una densidad aproximada de ½ de corteza por frasco.

Las células se mantuvieron en incubadora a 37 °C con 5% de CO₂. El medio se renovó a las 24 horas para eliminar restos tisulares y luego cada 3 días. Cuando la monocapa alcanzaba la confluencia, aproximadamente a los 10 días, es cuando se realizaban los experimentos de cuantificación de la expresión génica de los genes de interés.

Para obtener el ARN de las muestras de astrocitos cultivados se procedió a levantar las células empleando tripsina al 0,25%, la cual se dejó incubar durante 5 minutos a 37°C. Seguidamente se neutralizó la tripsina añadiendo medio DMEM completo. Posteriormente se realizó una centrifugación a 500 rpm durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Seguidamente se añadió al pellet 1 mL de PBS y se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones eliminando el sobrenadante. A continuación, se procedió a seguir el protocolo del kit de extracción de ARN por columnas “GeneJET ARN Purification Kit” (ThermoScientific). La cuantificación del ARN se realizó con el equipo NanoDrop (ThermoFisher). A partir de este punto para realizar las qPCRs se siguió el protocolo detallado en la sección 5 *PCR cuantitativa*.

8 Tratamiento con el compuesto T0 en la dieta

El agonista de los LXR T0901317 (T0) (Cayman Chemical) fue suplementado de forma directa en la dieta estándar de la que se alimentan los ratones, la Rod14. La dieta Rod14 con y sin suplementación con T0 fue formulada por Sodispan Biolab. En el caso de la dieta suplementada con T0 la concentración del compuesto fue 214 mg/kg. El alimento medicado fue almacenado a 4 °C protegido de la luz hasta su utilización para garantizar la estabilidad del compuesto.

El tratamiento comenzó a p60 y se mantuvo de forma continua en caso de los ratones *wild-type* hasta la semana 24 y en caso de los ratones hSOD1^{G93A} hasta que llegaban al punto final ético de experimentación (*ver la sección de Métodos 9.6 Supervivencia*). Los ratones tenían acceso ad libitum al agua y al alimento, asegurando una ingesta constante del compuesto. Para asegurar la estabilidad del compuesto, dieta fresca era añadida a las jaulas cada 3-4 días.

9 Fenotipado del efecto del compuesto T0 en el modelo hSOD1^{G93A}

Para evaluar el efecto que el agonista de los LXR, T0901317 ejerció en el modelo hSOD1^{G93A} un extenso fenotipado compuesto de diversas pruebas fue realizado: registro del peso corporal, evaluación de escala neurológica, hanging wire vertical, test de la fuerza de agarre, rotarod, electromiograma y supervivencia. Los detallados metodológicos de dichas pruebas se describen a continuación:

9.1 Escala Neurológica

Los animales fueron evaluados para detectar deterioro neurológico utilizando una escala numérica previamente publicada por Rodríguez-Cueto C et al., 2018¹⁵², con ligeras modificaciones. La escala comprendía un rango de 0 a 12 y se dividía en tres subescalas (0–4) centradas en la ambulación, la fuerza de agarre y el reflejo plantar posterior. Una puntuación final de 0 corresponde a animales asintomáticos, mientras que una puntuación de 12 refleja una pérdida funcional total de las extremidades posteriores y del control postural (ver detalles en la Tabla M6). La deambulación se evaluó observando su control postural y la manera en que apoyaba las patas traseras durante el movimiento. La prueba de fuerza valoró la capacidad del animal para arrastrarse y oponer resistencia cuando se tiraba suavemente de su cola en dirección opuesta a su desplazamiento sobre una rejilla metálica. Por último, el test del reflejo plantar posterior evaluó la rigidez de las extremidades y su coordinación cuando el ratón era suspendido por la cola a 10 cm de la superficie. La puntuación final se obtuvo sumando los valores alcanzados en cada subescala.

Puntuación Neurológica	
Ambulación	
0	Los animales apoyan toda la planta de las patas traseras al caminar.
1	Los animales no apoyan toda la planta de las patas traseras; caminan de puntillas.
2	Las patas traseras no responden correctamente durante la marcha (por ejemplo, resbalan)
3	Pérdida de coordinación al caminar. Los animales caminan de forma lateral.
4	Pérdida total del control motor (parálisis)
Fuerza de agarre	
0	Las patas traseras se mantienen bajo el cuerpo o muy cerca de él (muestran respuesta de resistencia).
1	Los animales tienden a separar las patas traseras del cuerpo y pierden progresivamente la respuesta de resistencia.
2	Ausencia de respuesta de resistencia. Las patas traseras se separan del cuerpo.
3	Los animales se desplazan lateralmente y muestran muy poca fuerza en las patas traseras.
4	Ausencia total de fuerza en las patas traseras.
Reflejo plantar posterior	
0	Las patas traseras adoptan una posición en T y muestran pataleo coordinado.
1	Pérdida progresiva de la posición en T y pataleo descoordinado.
2	Los animales estiran las patas traseras hacia atrás (posición caudal).
3	Los animales tienden a juntar las patas traseras e intentan levantar la cola del eje principal del cuerpo
4	Parálisis de las patas traseras.

Tabla M6. Evaluación neurológica seguida en este estudio. La escala comprende un rango de puntuación de 0 a 12 y se divide en tres subescalas (0–4) centradas en la ambulación, la fuerza de agarre y el reflejo plantar posterior.

9.2 Hanging Wire vertical

La fuerza muscular y la coordinación motora fueron evaluadas mediante una prueba modificada del *hanging wire*, realizada en posición vertical (Figura M2). Para ello, se utilizó una rejilla metálica vertical de 25x25cm, sostenida de forma perpendicular al plano horizontal. La prueba consistió en colocar al ratón en la parte central de la rejilla, permitiendo que se aferrara con las patas delanteras y traseras. Una vez que el animal se sujetaba firmemente, se registró el tiempo que lograba mantenerse aferrado mientras trepaba o permanecía en la rejilla, con un tiempo máximo de 60 segundos. Cada animal fue sometido a tres intentos, con un intervalo de recuperación de 5 minutos entre repeticiones para evitar fatiga muscular. Como medida final, se utilizó la media de los tres ensayos.

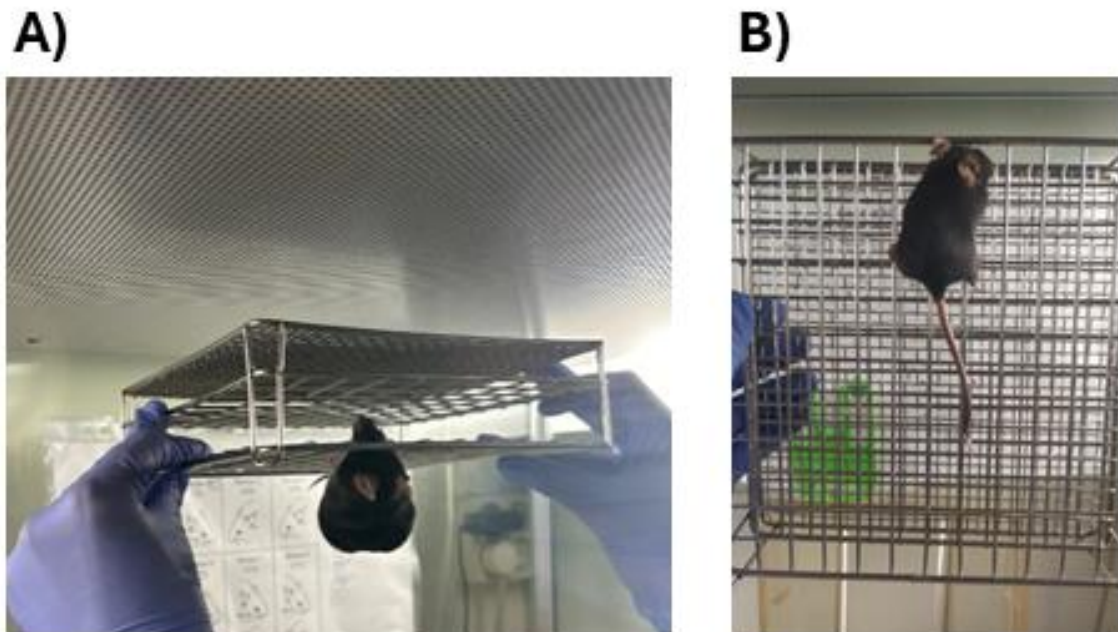


Figura M2. Evaluación de la fuerza de agarre en ratones mediante la prueba del hanging wire. A) Imagen de la prueba estándar, en la que el animal se coloca sobre la rejilla, la cual se gira 180° para evaluar su capacidad de sostenerse. B) Imagen de la adaptación en posición vertical empleada en este estudio, diseñada para permitir la medición de la fuerza de agarre en ratones *hSOD1^{G93A}* en estadios avanzados de la enfermedad, cuando la pérdida de fuerza impide realizar la versión estándar.

9.3 Test de fuerza de agarre

La fuerza muscular de agarre de las extremidades se evaluó mediante la prueba de fuerza de agarre utilizando un medidor de fuerza digital (Bioseb) (Figura M2). Los ratones fueron colocados con las patas delanteras y traseras sobre una rejilla metálica conectada al transductor de fuerza del equipo. Una vez que el animal se aferraba firmemente a la rejilla, se aplicó una tracción suave y constante desde la cola en dirección posterior hasta que liberaba el agarre. La fuerza máxima registrada fue tomada automáticamente por el equipo. Cada animal fue evaluado en tres ocasiones con un breve intervalo entre cada intento para evitar fatiga. Se utilizó la media de las tres mediciones para cada animal como valor final.

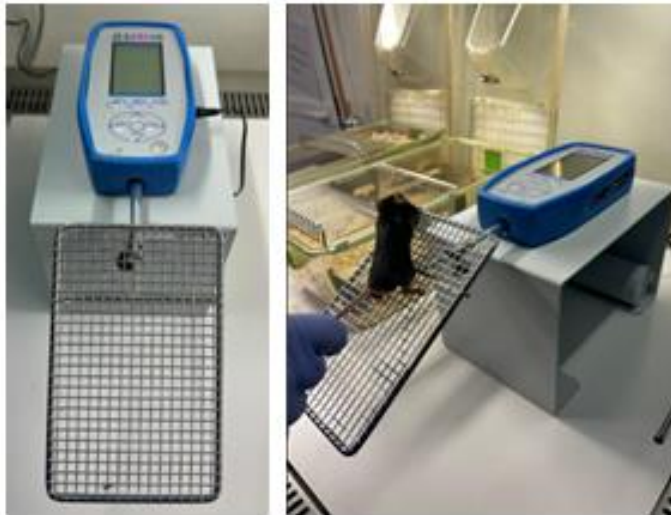


Figura M3. Medición de la fuerza de agarre en un ratón utilizando un dinamómetro digital. El animal se aferra a una rejilla conectada al dispositivo, mientras se aplica una tracción suave y constante en dirección opuesta para registrar la fuerza máxima ejercida por el animal antes de soltar la rejilla. Esta prueba permite evaluar la fuerza muscular y el estado neuromotor de manera cuantitativa.

9.4 Rotarod

La coordinación motora y el equilibrio fueron evaluados utilizando un equipo Rotarod (RotaRod/RS, Panlab, Harvard Apparatus) con rodillo de 3 cm de diámetro, dividido en compartimentos para permitir la evaluación simultánea de hasta cinco animales. Durante tres días consecutivos, los animales realizaron el mismo protocolo: dos pruebas a velocidad constante (4 rpm) durante 180 segundos seguidas de 3 pruebas a velocidad acelerada (de 4 rpm a 40 rpm) durante 300 segundos (Figura M3). Hubo un descanso mínimo de 10 minutos entre ambas. El parámetro registrado fue el tiempo de latencia hasta la caída, con un tiempo máximo de corte de 300 segundos. En caso de que un animal se aferrara pasivamente al rodillo sin caminar se le volvía recolocar en el rodillo y si lo realizaba una segunda vez el ensayo se interrumpía y se registraba como caída. Únicamente se utilizó el promedio de las pruebas a velocidad acelerada en el tercer día de experimento.



Figura M4. Test del rotarod para la evaluación del comportamiento motor y coordinación en ratones. La imagen muestra a cinco ratones colocados de forma individual en el rodillo durante una de las sesiones de entrenamiento.

9.5 Medición del Componente de Máxima Amplitud muscular (CMAP) mediante electromiografía.

El potencial compuesto de acción muscular (cMAP) fue registrado mediante electromiografía para evaluar la función neuromuscular en ratones. Se siguió el protocolo de Pollari et al., 2018¹⁵³ para la medición del CMAP muscular en estudios electromiográficos. Se utilizó un estimulador analógico (Grass Telefactor W. Warwick, RI USA modelo 588), una unidad de aislamiento de estímulo (modelo PSIU6 (Grass Instrument Co USA) y un amplificador AC/DC modelo 3000 (A-M Systems). La interfaz de grabación fue CED1401, y el software utilizado para la grabación y el posterior análisis fue Spike v8.04 (Cambridge Electronic Design Limited).

Los registros se realizaron bajo anestesia inhalada de isofluorano (Baxter), asegurando la ausencia de reflejos sin comprometer la función neuromuscular. Se utilizaron cinco electrodos de aguja monopolares estériles (Technomed) de uso subcutáneo: dos electrodos de estimulación (para estimular el nervio ciático), un electrodo de registro (alineado al músculo *tibialis anterior*), un electrodo de referencia (en el tendón de Aquiles) y el electrodo de tierra (en el lado opuesto del cuerpo) (Figura M5 A). Durante la estimulación se aplicaron pulsos eléctricos de una frecuencia de 1 pulso/s, una duración de 0,1 ms y unas intensidades crecientes desde 1 mA hasta 14 mA. El parámetro registrado fue la amplitud del cMAP (Figura M5 B), medido del pico máximo al mínimo en milivoltios, como indicador de la cantidad de axones funcionales.

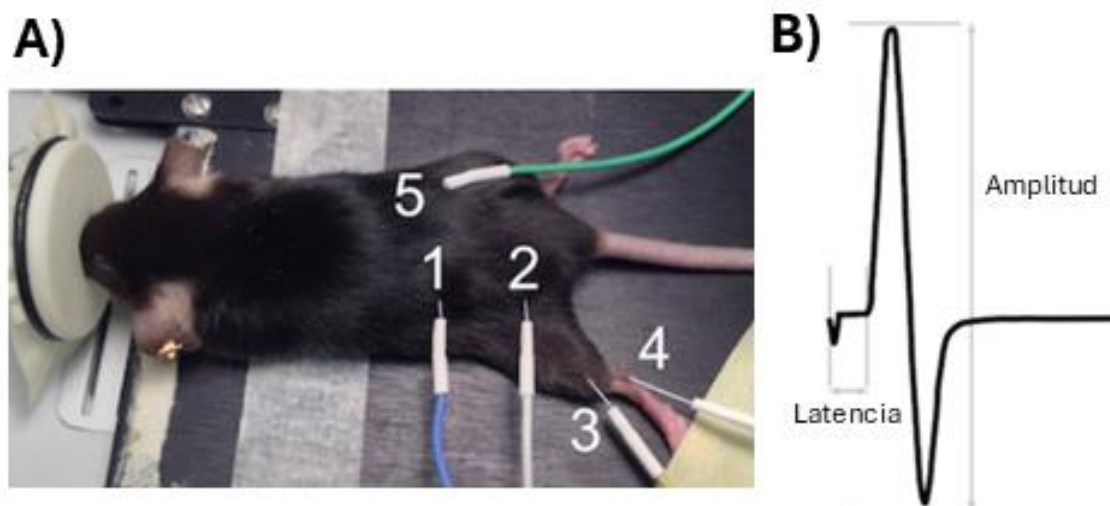


Figura M5. Registro del cMAP mediante electromiografía. A) Imagen de un ratón anestesiado al que se le está registrando el cMAP. 1 y 2 son los electrodos que estimulan al nervio ciático; 3 es el electrodo de registro del músculo *tibialis anterior*; 4 es el electrodo de referencia en el talón de Aquiles y 5 es la toma de tierra en el lado contrario del cuerpo. B) Representación de una respuesta de cMAP indicando que la amplitud se mide como la distancia entre el pico máximo y negativo de la onda bifásica.

9.6 Supervivencia

La supervivencia de los animales fue monitorizada diariamente desde que la sintomatología estaba muy avanzada (>p130) hasta el final del estudio. El punto final fue definido como el día en el que el animal no podía enderezarse por sí mismo en un período de 15 segundos tras ser colocado de lado, criterio ampliamente aceptado como indicador de sufrimiento grave y pérdida de autonomía motora en este modelo murinos hSOD1^{G93A} (fuente: *Working with ALS mice: Guidelines for preclinical testing and colony management*, The Jackson Laboratory). Los animales que alcanzaban este criterio fueron eutanasiados humanitariamente mediante dislocación cervical o cámara de CO2 previo tratamiento anestésico. La edad al momento de alcanzar este punto se registró como la edad de muerte.

Los datos de supervivencia fueron representados mediante curvas de Kaplan-Meier, y las diferencias entre grupos fueron analizadas utilizando el test de log-rank (Mantel-Cox). El análisis estadístico fue realizado en GraphPad Prism v8.0

10 Comparativa de estudios de RNA-seq de médulas espinales de modelos murinos con mutaciones en genes relacionados con la ELA

Para realizar esta comparativa se seleccionaron tres estudios de RNA-seq realizados llevados a cabo en nuestro laboratorio:

Modelo animal	Tejido	Edad	Sexo	Referencia
hSOD1 ^{G93A} vs WT (n=5)	Médula Espinal	3 meses	Hembras	Fernández-Beltrán LC et al., 2021 ¹⁵⁴
TDP-43 ^{M323K/M323K} vs WT (n=4)	Médula Espinal	9 meses	Machos	García-Toledo I et al., 2025 (Pre-print) ¹⁵⁵
FUSDelta14(HOM) vs WT (n=4)	Médula Espinal	2 meses	Machos	Ali et al., 2023 ¹⁵⁶

Tabla M7. Resumen de las características de los estudios de RNA-seq seleccionados para comparar el transcriptoma del metabolismo del colesterol en modelos murinos con mutaciones en distintos genes relacionados con la ELA.

De todos los estudios se partió de los datos de secuenciación crudos en formato .fastq y se aplicó el pipeline bioinformático especificado en la sección de Métodos 2.2 *Análisis Bioinformático del RNA-seq*. De nuevo para identificar los genes diferencialmente expresados (DEGs) se utilizó un p-valor ajustado menor de 0,05 y para identificar los DEGs lipídicos se comparó el número total de DEGs con una lista de 1.587 genes lipídicos (ver sección de Métodos 2.2 *Análisis Bioinformático del RNA-seq, Identificación de genes relacionados con lípidos*, para más detalles sobre la obtención de la lista de genes lipídicos). Además, para realizar el diagrama de Venn se utilizó la herramienta online Venny v2.1 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny>).

La lista de los genes de síntesis de colesterol analizados fue: "Acat1","Acat2","Hmgcs1","Hmgcs2","Hmgcr","Mvk","Pmvk","Mvd","Idi1","Idi2","Fdps","Gggs1","Fdft1","Sqle","Lss","Cyp51", "Dhcr24", "Tm7sf2","Msmo1","Nsdhl", "Hsd17b7", "Ebp", "Sc5d","Dhcr7", "Srebf2"

La lista de los genes de transporte de colesterol analizados fue: "Abca1", "Abcg1", "Abcg4", "Adipoq", "Anxa2", "Apoa1", "Apob", "Apoc1", "Apoe", "Arv1", "Cav1", "Cd36", "Cel", "Eepd1", "Egf", "Furin", "Gps2", "Gramd1a", "Gramd1b", "Gramd1c", "Lamtor1", "Lcat", "Ldlr", "Lpcat3", "Lrp1", "Msr1", "Npc1", "Npc2", "Nr1h2", "Nr1h3", "Nus1", "Osbp", "Pcsk9", "Pltp", "Scarb1", "Scp2", "Soat1", "Soat2", "Star", "Stard3", "Stard4", "Trem2", "Tspo2", "Vldlr"

11 Mendelian Randomization

Se utilizaron resúmenes estadísticos de datos poblacionales para llevar a cabo un análisis de aleatorización mendeliana (*Mendelian Randomization*) con el objetivo de evaluar la posible relación causal, por la predisposición genética, de diferentes características relacionadas con el metabolismo lipídico y la ELA.

Para identificar los conjuntos de datos de factores de riesgo lipídicos adecuados, realizamos una búsqueda exhaustiva en PubMed y en el catálogo de MR-Base de los estudios de asociación del genoma completo (GWAS) más recientes disponibles hasta diciembre de 2020, centrándonos en rasgos metabólicos lipídicos que influyen en los niveles de lípidos circulantes en sangre. Los estudios GWAS se seleccionaron aplicando los siguientes criterios: (i) fecha de publicación más actual, (ii) que no hubieran sido utilizados previamente en otras publicaciones para este tipo de análisis, (iii) mayor tamaño muestral disponible, y (iv) disponibilidad de datos curados en el catálogo de MR-Base.

Los rasgos de exposición seleccionados fueron: “Triglicéridos totales” (TG), “Colesterol total” (TC), “Colesterol LDL” (LDL), “Colesterol HDL” (HDL), “Ácido linoleico,” “Docosahexaenoato” (DHA), “Ácidos grasos omega-3,” “Ácidos grasos omega-6” y “Ácidos grasos totales”.

Como base de datos de la ELA se utilizó un estudio de asociación del genoma completo (GWAS) de 2018, que incluyó un total de 80.610 individuos, de los cuales 20.806 eran casos de ELA y 59.804 controles, analizando un total de 10.031.630 variantes genéticas¹⁵⁷.

Para realizar el análisis de MR se utilizó un algoritmo desarrollado por Hemani et al. 2018¹⁵⁸, implementado en el paquete de R TwoSampleMR (versión 4.26). Todos los análisis se llevaron a cabo utilizando RStudio (versión 1.4.1717, 2021) y R (versión 4.1.1). Este paquete proporciona acceso a una base de datos curada de resultados de GWAS resumidos y permite evaluar posibles relaciones causales entre diferentes factores de riesgo y patologías.

El enfoque de MR se basa en tres supuestos fundamentales: (i) que las variables instrumentales (IVs, en nuestro caso los polimorfismos de un solo nucleótido) se asocian de forma significativa con los factores de riesgo; (ii) que las IVs son independientes de factores de confusión; y (iii) que el riesgo de sufrir la patología está influenciado exclusivamente a través del efecto de las IVs.

Para cada análisis individual de MR se identificaron las IVs asociadas a cada rasgo en base a los odds ratios por alelo (coeficientes beta) y los errores estándar (SE) de todos los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), aplicando un umbral de significación estadística de $p < 5 \times 10^{-8}$. A continuación, el algoritmo extrajo los SNPs correspondientes de los conjuntos de datos de la patología (ELA), conservando solo aquellos SNPs presentes tanto en los datos de factores de riesgo como en los de la patología.

La asociación causal entre los factores de riesgo y la patología se evaluó principalmente mediante el método de ponderación por varianza inversa (IVW). Los rasgos se consideraron con efecto significativo cuando el p valor fue inferior a 0,05. Para corregir los análisis por comparaciones múltiples se aplicó el método de corrección de Bonferroni. El enfoque IVW se basa en la suposición de que las variantes genéticas utilizadas como instrumentos son independientes y que no existe pleiotropía horizontal que pudiera sesgar la asociación a través de otras vías biológicas¹⁵⁹. Por ello, para reforzar la solidez de los resultados, se llevaron a cabo análisis de sensibilidad adicionales utilizando métodos que tienen en cuenta la pleiotropía, entre ellos la regresión MR-Egger, la mediana simple y la mediana ponderada.

12 Estadística

El análisis estadístico se realizó utilizando GraphPad Prism 8.0.2 y R 4.3.2. Se compararon dos grupos con un único punto temporal utilizando la prueba *t* de Student. Se compararon dos grupos en múltiples puntos temporales utilizando ANOVA de dos vías con prueba post hoc de comparaciones múltiples de Tukey. La significancia estadística se definió como $p \leq 0,05$ para el análisis de fenotipos y datos de biología molecular. En las leyendas de las figuras aparece el tamaño de muestral. Los detalles estadísticos de cada experimento se pueden encontrar en las leyendas de las figuras. Cuando se indica, $* = p \leq 0,05$, $** = p \leq 0,01$, $*** = p \leq 0,001$, $**** = p \leq 0,0001$.

Resultados

Resultados

Bloque 1. Meta-análisis del transcriptoma lipídico de la médula espinal en ratones con mutación en *SOD1*

1.1 Análisis del transcriptoma de la médula espinal de ratones hSOD1^{G93A}

Con el objetivo de identificar alteraciones en el metabolismo lipídico durante fases tempranas de la enfermedad, se llevó a cabo un análisis transcriptómico mediante la secuenciación del ARN (RNA-seq) en médula espinal de ratones hembra hSOD1^{G93A} y sus controles *wild-type* (n = 5 por grupo). La edad seleccionada para el estudio fue p90, dado que este punto temporal se reconoce ampliamente como el inicio de la fase sintomática en este modelo⁶⁹. El análisis reveló un total de 1173 genes diferencialmente expresados (DEGs) entre los ratones transgénicos y los controles, con valores de log₂FoldChange comprendidos entre -1.5 y +1.5. De estos, 639 genes mostraron una sobreexpresión y 535 estaban reprimidos. Entre los DEGs más significativamente alterados se encontraron genes previamente vinculados a la patología mediada por SOD1^{G93A}, como *Trem2*, *Nefh*, *C1q*, *Ccl6* y *Mmp9*, los cuales se destacan en el volcano-plot (Figura R1).

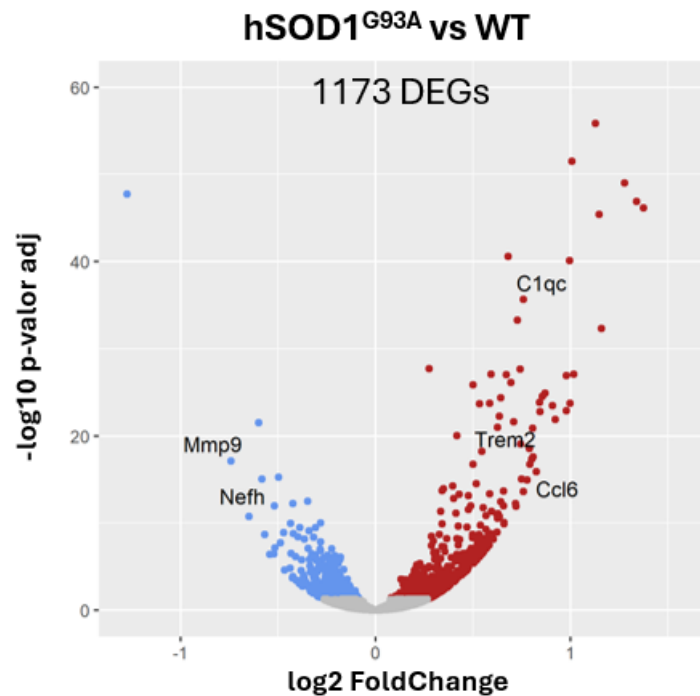
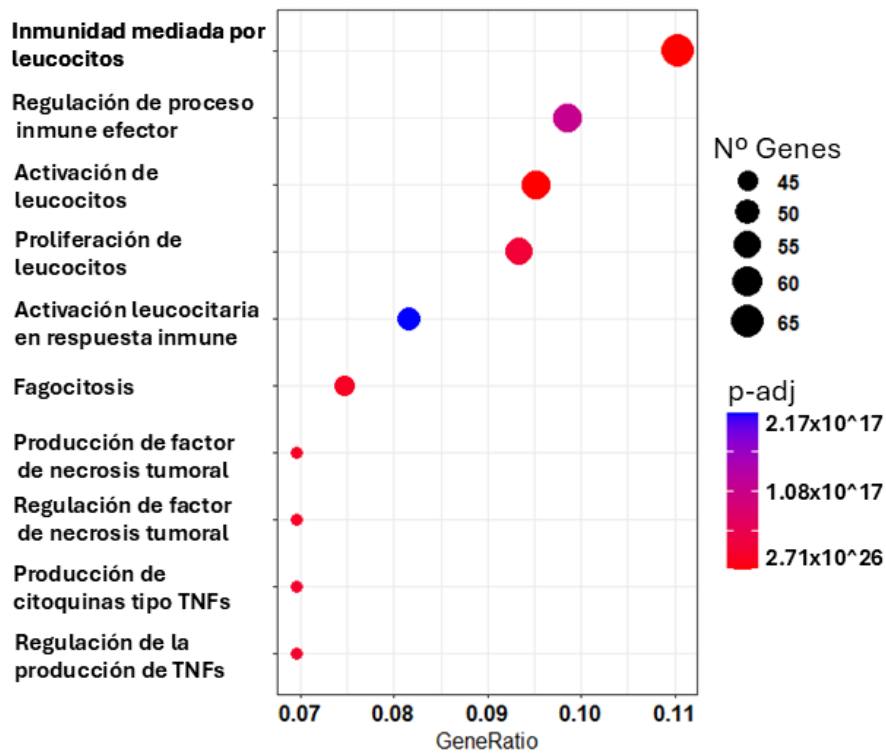


Figura R1. Análisis transcripcional de la médula espinal de hembras hSOD1^{G93A} y sus controles de camada WT a los 90 días de edad (p90). Gráfico tipo *volcano* que muestra los cambios en la expresión de los DEGs, donde los puntos rojos indican genes significativamente sobreexpresados, los puntos azules indican genes significativamente infraexpresados y los puntos grises indican genes sin cambios significativos.

A continuación, se llevó a cabo un análisis de ontología génica con el objetivo de identificar los procesos biológicos en los que se encuentran implicados los genes diferencialmente expresados (DEGs). Para ello, se utilizó un análisis de sobre-representación (Over-Representation Analysis, ORA), también conocido como análisis de enriquecimiento funcional. Este análisis reveló que los genes sobreexpresados estaban significativamente asociados con la activación del sistema inmune, destacando procesos como la activación y proliferación de leucocitos, así como la producción de mediadores proinflamatorios, incluyendo factores de necrosis tumoral y diversas citoquinas (Figura R2 A). En contraste, los genes reprimidos se relacionaron de forma significativa con funciones propias del sistema nervioso, como la axonogénesis y el transporte de neurotransmisores (Figura R2 B). Ambos hallazgos, tanto la activación de rutas proinflamatorias como la disfunción en procesos relacionados con el transporte axonal, son consistentes con estudios previos que describen mecanismos fisiopatológicos en el modelo hSOD1^{G93A} 24.

A) Vías Sobreexpresadas



B) Vías Reprimidas

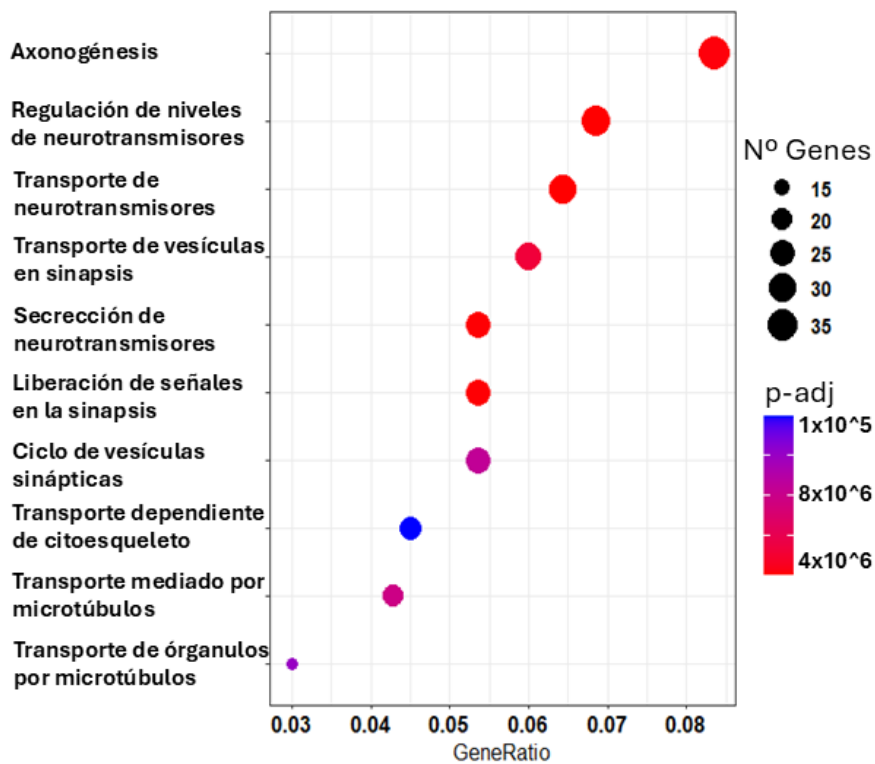


Figura R2. Diagramas de puntos mostrando los procesos biológicos más desregulados identificados mediante *Over-Representation Analysis* (ORA) en la médula espinal del ratón *hSOD1^{G93A}*. En el gráfico A) utilizando para el análisis los DEGs identificados como sobreexpresados y en B) los DEGs inhibidos. El tamaño del punto indica el número de genes que participan en ese proceso. El color del punto indica el p-valor ajustado, siendo rojo más significancia estadística y azul menos.

El análisis de enriquecimiento génico reveló la desregulación de algunos procesos relacionados con el metabolismo lipídico. Sin embargo, este tipo de análisis presenta limitaciones cuando se aplica en fases tempranas de una patología, ya que puede no detectar procesos en los que el número de genes diferencialmente expresados (DEGs) es reducido. Para obtener una visión más completa de la desregulación de genes lipídicos se aplicó un enfoque dirigido. Este consistió en comparar los 1.173 DEGs identificados en el análisis de RNA-seq con una lista de genes relacionados con el metabolismo de lípidos. Dicha lista se generó a partir de la anotación ontológica de genes asociados a los términos “Procesos del metabolismo lipídico” (GO:0006629) y “Transporte lipídico” (GO:0006869), lo que resultó en un total de 1.587 genes lipídicos. Al comparar ambas listas se obtuvo que 127 de los genes diferencialmente expresados en la médula espinal correspondían a genes implicados en funciones lipídicas (Figura R3).

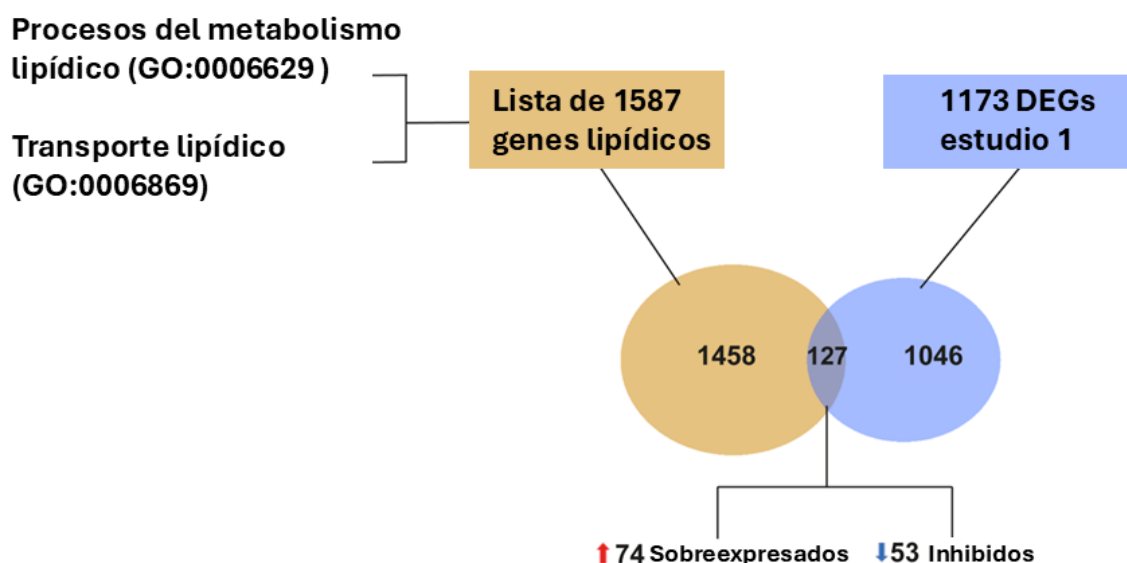


Figura R3. Representación gráfica de la identificación de genes relacionados con el metabolismo lipídico entre el total de DEGs identificados en p90. La lista de genes lipídicos se obtuvo combinando los genes anotados en los términos de GO “procesos de metabolismo lipídico” (GO:0006629) y “transporte de lípidos” (GO:0006869), lo que resultó en un total de 1.587 genes lipídicos anotados. El diagrama de Venn muestra que, de los 1.173 DEGs identificados en nuestro estudio, un total de 127 corresponden a genes lipídicos, de los cuales 74 están sobreexpresados y 53 infraexpresados.

1.2 Meta-análisis de estudios de RNA-seq de ratones hSOD1^{G93A}

Diversos estudios han identificado numerosas alteraciones en el metabolismo lipídico en estadios avanzados de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), tanto en pacientes como en modelos animales^{127,160}. Sin embargo, no está claro cuáles de estos cambios están presentes desde las fases iniciales de la enfermedad. En nuestro estudio de RNA-seq observamos alteraciones transcripcionales moderadas en 127 genes relacionados con el metabolismo lipídico. Dado que este tipo de análisis puede presentar una elevada variabilidad (por factores como diferencias en las condiciones ambientales del animalario, la disección del tejido o la preparación de las librerías) decidimos reforzar la robustez y consistencia de nuestros hallazgos mediante un meta-análisis con otros estudios transcriptómicos comparables que hubieran analizado médulas espinales de ratones transgénicos con mutaciones en *Sod1* en estadios iniciales de la patología (~p90).

Además, seleccionamos estudios transcriptómicos adicionales de médula espinal de modelos con mutación en *Sod1* en estadios avanzados (>p120), con el objetivo de estudiar la evolución temporal de las alteraciones observadas inicialmente. La búsqueda de estos estudios se llevó a cabo en el repositorio *Gene Expression Omnibus* (GEO, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). Para el meta-análisis de los estadios iniciales (MA-inicial) se incluyeron nuestro propio estudio (estudio 1) y otros dos estudios obtenidos de GEO (estudios 2 y 3). Para el análisis correspondiente a estadios avanzados (MA-avanzado) se seleccionaron tres estudios adicionales del mismo repositorio (estudios 4, 5 y 6). Las principales características de estos estudios de RNA-seq se detallan en la Tabla M3 de la sección de Materiales y Métodos 3 *Meta-análisis de estudios de RNA-seq*.

Para realizar el meta-análisis de estudios iniciales (MA-inicial) se descargaron los datos crudos del estudio 2 y 3 para reanalizarlos usando el mismo pipeline de programas bioinformáticos usados para analizar nuestro estudio 1. Este análisis identificó 721 y 1273 DEGs en la médula espinal de los ratones *SOD1* de los estudios 2 y 3 respectivamente, lo cual dio un rango en el número de DEGs similar al obtenido en nuestro estudio (1173 DEGs). Una vez analizados cada estudio de manera independiente se utilizó el paquete de R *metaRNAseq* para realizar el MA-inicial¹⁴⁹. Este software emplea métodos estadísticos de combinación de *p* valores de estudios de RNA-seq independientes para identificar genes diferencialmente expresados de forma más robusta y confiable. El MA-inicial en la médula de los ratones *SOD1* identificó 1520 DEGs (Figura R4), lo cual es un número más alto de DEGs que el obtenido en cualquiera de los tres estudios analizados. Este hecho no es sorprendente ya que al combinar *p* valores de estudios independientes el aumento de poder estadístico resulta en una mayor identificación de genes. De esos 1520 DEGs del MA-inicial, 839 también se encontraron en nuestro estudio 1, 596 en el

estudio 2 y 744 en el estudio 3. Además, 75 de los genes identificados en el meta-análisis no fueron detectados por p-adj en ninguno de los tres estudios.

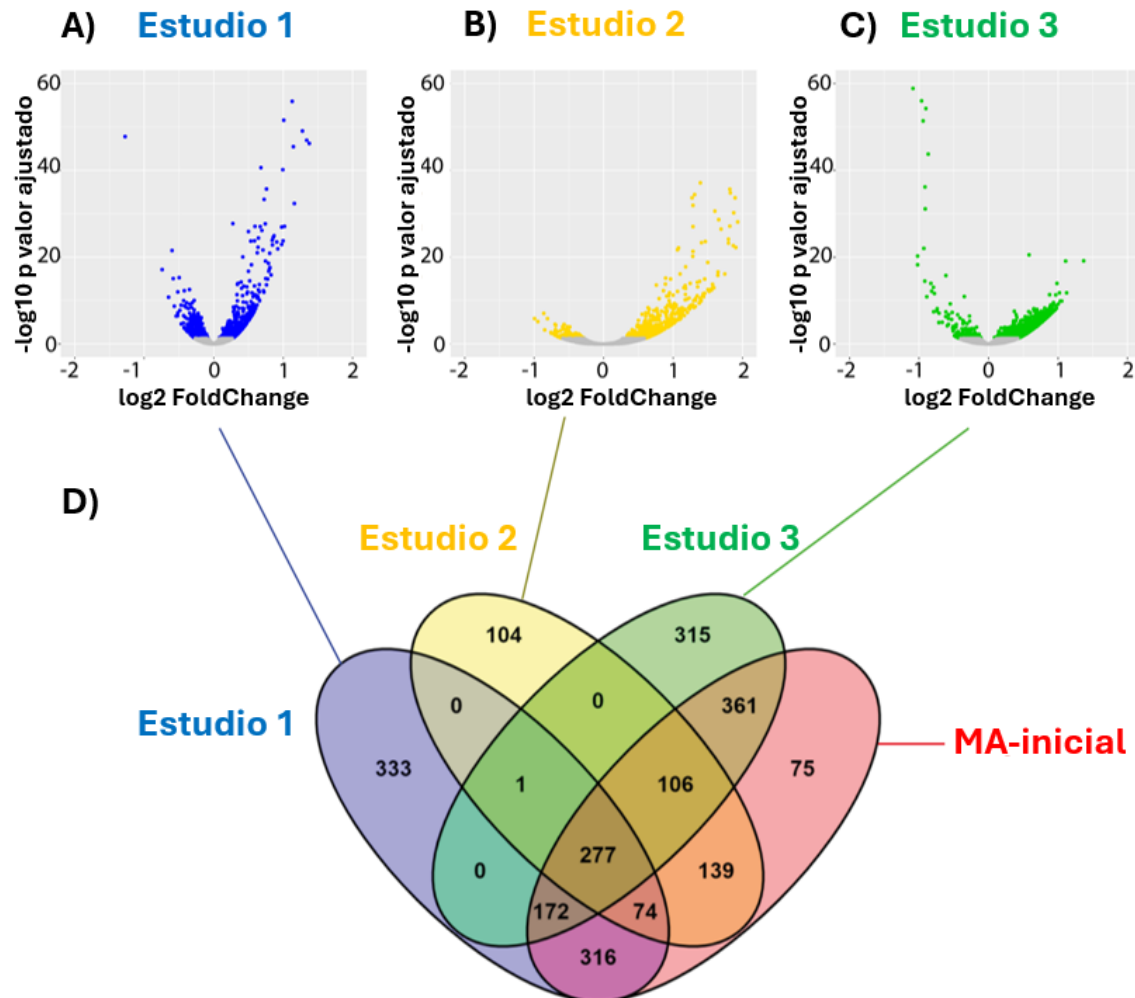


Figura R4. Meta-análisis de estudios de RNA-seq en estadio inicial. A–C) Gráficos tipo *volcano* que muestran los DEGs identificados en cada uno de los tres estudios de RNA-seq seleccionados en p90. Los puntos azules, amarillos y verdes representan los DEGs encontrados en los estudios 1, 2 y 3, respectivamente. Los puntos grises indican genes sin cambios significativos. D) Diagrama de Venn que ilustra la superposición de los DEGs entre los tres estudios y el resultado del meta-análisis (MA-inicial). El MA-inicial se realizó utilizando el test de combinación de probabilidades de Fisher, ajustando los p valores crudos mediante el método de tasa de descubrimiento falso (FDR) de Benjamini–Hochberg. Los p valores ajustados inferiores a 0,01 se consideraron estadísticamente significativos.

Con el objetivo de identificar cambios específicos y consistentes en genes relacionados con el metabolismo lipídico en la médula espinal, se compararon los DEGs obtenidos en el MA-inicial con la misma lista de 1587 genes asociados al metabolismo de lípidos utilizada en el apartado anterior. Esta estrategia permitió identificar 166 DEGs lipídicos en el MA-inicial, como se muestra en el diagrama de Venn (Figura R5). Nuestro estudio 1 había detectado 127 genes vinculados al metabolismo lipídico (Figura R3), de los cuales 93 coincidían con los encontrados en el MA-inicial. Esto confirma que el meta-análisis permite detectar un mayor número de alteraciones en la expresión de genes lipídicos en fases tempranas de la enfermedad.

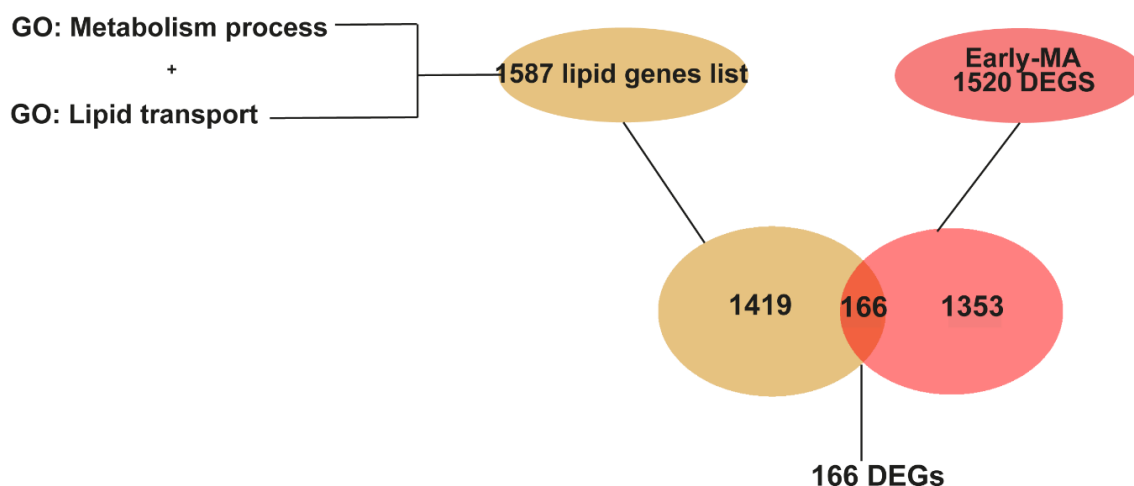


Figura R5. Representación gráfica de la identificación de genes relacionados con el metabolismo lipídico entre los DEGs del MA-inicial. La lista de genes relacionados con el metabolismo lipídico se obtuvo a partir de aquellos anotados en los términos de GO “procesos de metabolismo lipídico” (GO:0006629) y “transporte de lípidos” (GO:0006869). El diagrama de Venn muestra que 166 DEGs del MA-inicial corresponden a genes relacionados con lípidos.

A continuación, se analizó en qué rutas metabólicas participaban los 166 DEGs lipídicos identificados en el MA-inicial. Para ello, se utilizó STRING, una herramienta que genera redes de interacción proteína-proteína. Este análisis reveló varios nodos de interacción, es decir, grupos de proteínas que interactúan entre sí y que, por tanto, podrían estar involucrados en los mismos procesos biológicos. Para identificar cuáles eran estas rutas, se realizó un análisis de enriquecimiento funcional. Se destacaron los términos de ontología génica (*GO terms*) más relevantes, omitiendo aquellos demasiado generales, y se representaron con los siguientes colores: metabolismo del colesterol (rojo, 19 genes), metabolismo de esfingolípidos (azul, 17 genes), regulación de la actividad de MAPK (verde, 16

genes), metabolismo de eicosanoides (amarillo, 11 genes) y biosíntesis de fosfolípidos (rosado, 21 genes) (Figura R6).

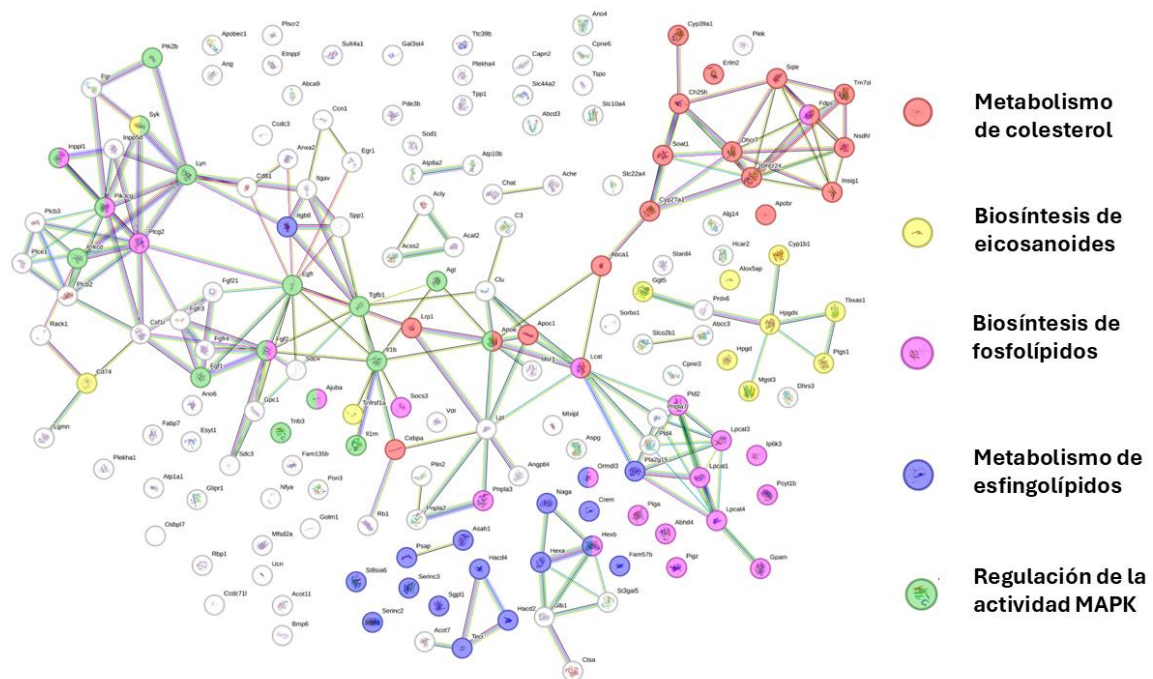


Figura R6. Red de interacción proteína-proteína de los DEGs relacionados con lípidos del MA-inicial. La mayoría de clusters de la red participaban en cinco procesos lipídicos que se codificaron por colores de la siguiente manera: procesos metabólicos de esfingolípidos (azul), procesos metabólicos del colesterol (rojo), procesos de biosíntesis de eicosanoides (amarillo), procesos de biosíntesis de fosfolípidos (morado), regulación de la actividad de las MAPK (verde).

Con la intención de conocer cómo evolucionan las alteraciones detectadas en estadios iniciales hacia las fases sintomáticas de la patología, se repitió el análisis de RNA-seq y el meta-análisis con los tres estudios correspondientes a etapas tardías (estudios 4, 5 y 6). El análisis de RNA-seq identificó 1.272, 4.623 y 9.543 DEGs en los estudios 4, 5 y 6, respectivamente (Figura R7). El menor número de DEGs encontrados en el estudio 4 era esperable, ya que la edad de los ratones era de 4 meses, mientras que en los otros dos estudios los ratones tenían 5 meses.

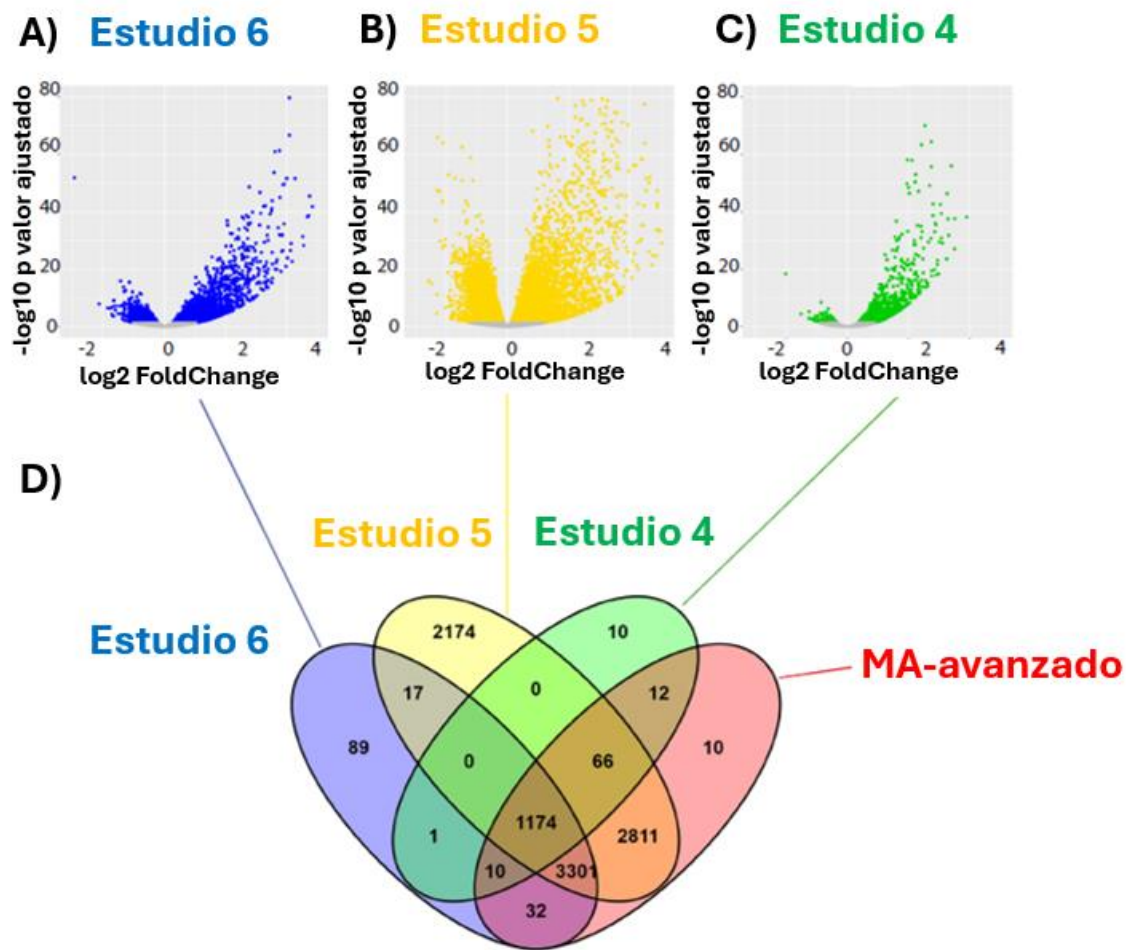


Figura R7. Meta-análisis de estudios de RNA-seq en estadios avanzados. A–C) Gráficos tipo *volcano* que muestran los DEGs identificados en cada uno de los tres estudios de RNA-seq seleccionados en edades $>p120$. Los puntos azules, amarillos y verdes representan los DEGs encontrados en los estudios 4, 5 y 6, respectivamente. Los puntos grises indican genes sin cambios significativos. D) Diagrama de Venn que ilustra la superposición de los DEGs entre los tres estudios y el resultado del meta-análisis (MA-avanzado). El MA-avanzado se realizó utilizando el test de combinación de probabilidades de Fisher, ajustando los p valores crudos mediante el método de tasa de descubrimiento falso (FDR) de Benjamini–Hochberg. Los p valores ajustados inferiores a 0,01 se consideraron estadísticamente significativos.

El meta-análisis de estadios avanzados (MA-avanzado) identificó 7.416 DEGs (Figura R7), lo que corrobora la profunda desregulación transcriptómica que ocurre en la médula espinal de los ratones *SOD1* cuando la enfermedad está avanzada. Estos 7.416 DEGs fueron contrastados con la lista de 1.520 genes lipídicos, lo que permitió determinar que 690 de ellos estaban relacionados con el metabolismo lipídico.

Además, la mayoría de los genes lipídicos identificados en el MA-inicial (~95%) también aparecieron y con una mayor expresión, en el MA-avanzado, lo que respalda la solidez de estos hallazgos. Al generar la red de interacción en STRING con estos 690 DEGs lipídicos, nuevamente se observaron numerosos nodos, los cuales fueron sometidos a un análisis de enriquecimiento funcional. Los procesos en los que participaban estos genes eran muy similares a los observados en el MA-inicial: metabolismo del colesterol (rojo, 57 genes), metabolismo de esfingolípidos (azul, 69 genes), biosíntesis de eicosanoides (amarillo, 28 genes), regulación positiva de las MAPK (verde, 66 genes), biosíntesis de fosfolípidos (morado, 102 genes) y catabolismo de ácidos grasos (cian, 49 genes) (Figura R8).

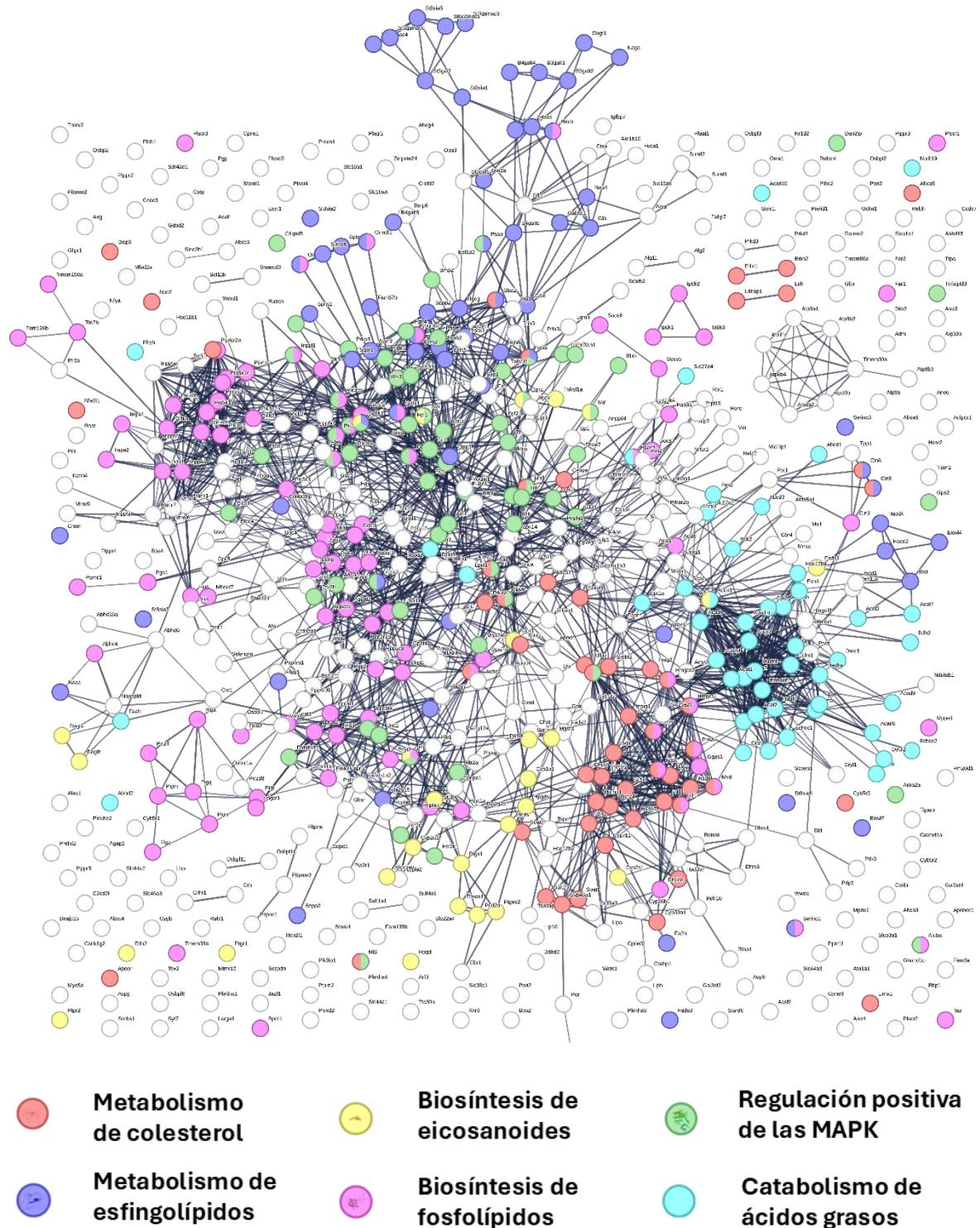


Figura R8. Red de interacción proteína-proteína de los DEGs relacionados con lípidos del MA-avanzado. La mayoría de clusters de la red participaban en seis procesos lipídicos que se codificaron por colores de la siguiente manera: procesos metabólicos de esfingolípidos (azul), procesos metabólicos del colesterol (rojo), procesos de biosíntesis de eicosanoides (amarillo), procesos de biosíntesis de fosfolípidos (morado), regulación positiva de las MAPK (verde), catabolismo de ácidos grasos (cian).

1.3 Estudio de las principales vías del metabolismo de lípidos alteradas en los ratones con mutación en *SOD1*

Con los resultados anteriores, hemos observado que el número de genes lipídicos desregulados aumenta significativamente desde el estadio inicial al avanzado. Con el objetivo de evaluar los niveles de expresión de los genes implicados en las rutas del metabolismo lipídico desreguladas en los meta-análisis, se generaron mapas de calor del valor de “fold-change” de estos genes. Basándonos en la bibliografía acerca de alteraciones lipídicas en pacientes (consultar sección de Introducción 3 *Alteraciones lipídicas en pacientes de ELA*) y los resultados del MA-inicial, se decidió que las rutas más interesantes de analizar eran: el metabolismo de esfingolípidos, de eicosanoides y del colesterol.

1.3.1 Metabolismo de esfingolípidos

Los esfingolípidos son componentes clave del sistema nervioso central, especialmente abundantes en la mielina, y participan en la organización de membranas y en la señalización celular. Su principal molécula precursora es la ceramida, que actúa como nodo central del metabolismo de esfingolípidos. A partir de ella se ramifican varias rutas metabólicas: la síntesis *de novo* de ceramidas a partir de serina y palmitoil-CoA; la síntesis de esfingomielina (esencial para la integridad de la mielina); la síntesis de glucoesfingolípidos complejos (implicados en el reconocimiento celular y la sinaptogénesis); y la generación de esfingosina-1-fosfato (una molécula señalizadora involucrada en la supervivencia y migración celular) (para una explicación más detallada consultar la sección de la Introducción 2.1 *Metabolismo de esfingolípidos*).

Para evaluar los niveles de expresión génica en estadios iniciales y avanzados, se generó un *heatmap* que incluía los genes del metabolismo de esfingolípidos detectados en el MA-inicial, junto con los principales genes implicados en las cuatro rutas mencionadas. Este análisis reveló tres *clusters* de genes diferenciados (Figura R9).

En el primer *cluster*, se observó una sobreexpresión en los estudios de estadios iniciales (p90), la cual se exacerbaba en los estadios avanzados (>p120). Estos genes estaban mayoritariamente implicados en el catabolismo de glucoesfingolípidos complejos y en la síntesis de esfingosina-1-fosfato (*Hexa*, *Hexb*, *Naga*, *Gla*, *Glb1*, *Galc*, *Gba*, *Psap*, *Ctsa*, *Asah1*, *Sgpl1*, *Plpp3*). El segundo

cluster mostró una inhibición leve en fases tempranas que se intensificaba en los estudios correspondientes a la sintomatología avanzada. Estos genes participaban principalmente en la síntesis de glucoesfingolípidos complejos (*Ugcg*, *Ugt8a*, *B4galnt1*, *St8sia1*). En el tercer *cluster*, los niveles de expresión estaban levemente desregulados y de forma inconsistente entre los distintos estudios, lo que sugiere que no experimentaban una alteración significativa. Estos genes estaban involucrados en la síntesis *de novo* de ceramidas y en la síntesis de esfingomiélinina (Figura R9).

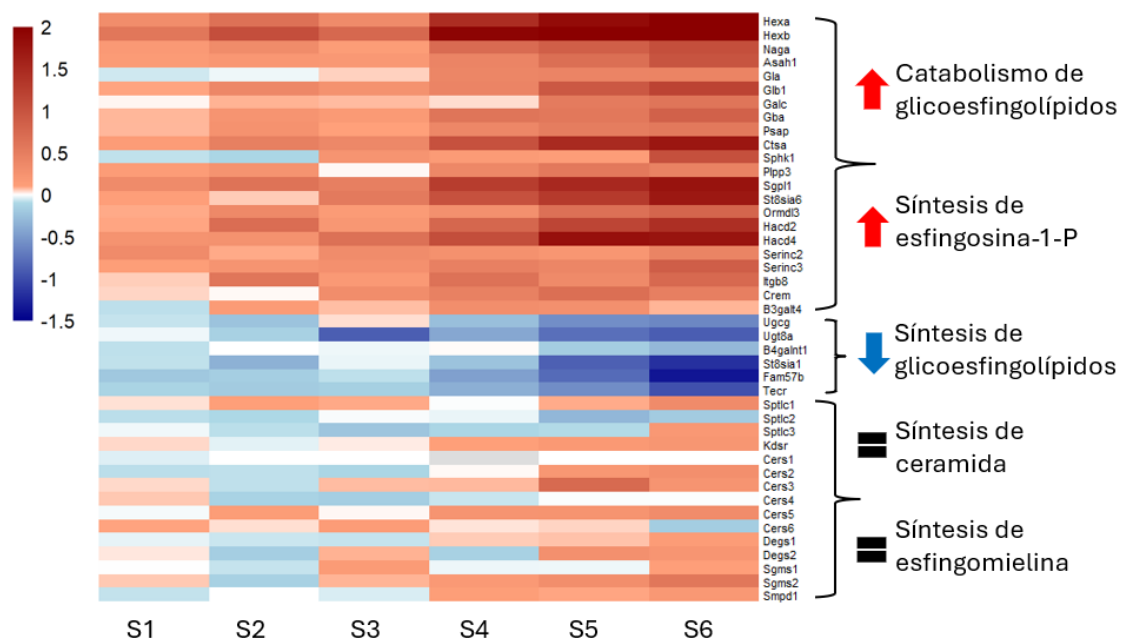


Figura R9. Comparativa de las alteraciones transcripcionales en las vías metabólicas de esfingolípidos en la médula espinal de ratones *SOD1* en estadios sintomáticos tempranos y avanzados. Mapa de calor que combina seis estudios transcriptómicos (S1-3: estadio sintomático temprano y S4-6: estadio sintomático avanzado), mostrando los niveles de expresión de los principales genes que participan en las vías metabólicas de los esfingolípidos. Los colores del mapa de calor representan los niveles de expresión según los valores del $\log_2\text{Foldchange}$. Cada columna corresponde a un estudio individual de RNA-seq y cada fila a un gen.

1.3.2 Metabolismo de eicosanoides

Los eicosanoides son lípidos bioactivos derivados del ácido araquidónico, un ácido graso poliinsaturado que se libera de los fosfolípidos de membrana. A partir de este precursor, distintas vías enzimáticas generan prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos y lipoxenos, moléculas clave en procesos como la inflamación, la hemostasia y la respuesta inmune (para una explicación más detallada consultar la sección de Introducción 2.2 *Metabolismo de eicosanoides*).

En el *heatmap* diseñado para evaluar los niveles de expresión en estadios iniciales y tardíos, se decidió incluir los genes del metabolismo de eicosanoides detectados en el MA-inicial, junto con los principales genes involucrados en esta vía. Al generar dicho *heatmap*, se observó que la mayoría de estos genes se encuentran sobreexpresados desde el estadio inicial (p90), y que esta sobreexpresión aumenta con el progreso de la patología (Figura R10).

Además, se elaboró un esquema simplificado de la biosíntesis de los distintos tipos de eicosanoides, destacando los principales genes implicados. Uno de los genes identificados en el MA-inicial es *Pla2g15*, de especial relevancia, ya que participa en la síntesis del ácido araquidónico, el precursor común de los distintos tipos de eicosanoides. Asimismo, el MA-inicial mostró sobreexpresión de genes clave para la síntesis de prostaglandinas (*Ptgs1*), tromboxanos (*Tbxas1*), leucotrienos (*Ggt5*) y lipoxenos (*Hpgd*) (Figura R11). En el MA-avanzado, se observa el incremento transcripcional de las mismas vías que en el MA-inicial, y además se identificaron como sobreexpresados genes involucrados en la síntesis de metabolitos intermedios, como el PGG2 (sintetizado por *Acox1* y *Acox3*) y el 5-HETE (producido por *Alox5*), correspondientes a las rutas de prostaglandinas/tromboxanos y leucotrienos/lipoxenos, respectivamente.

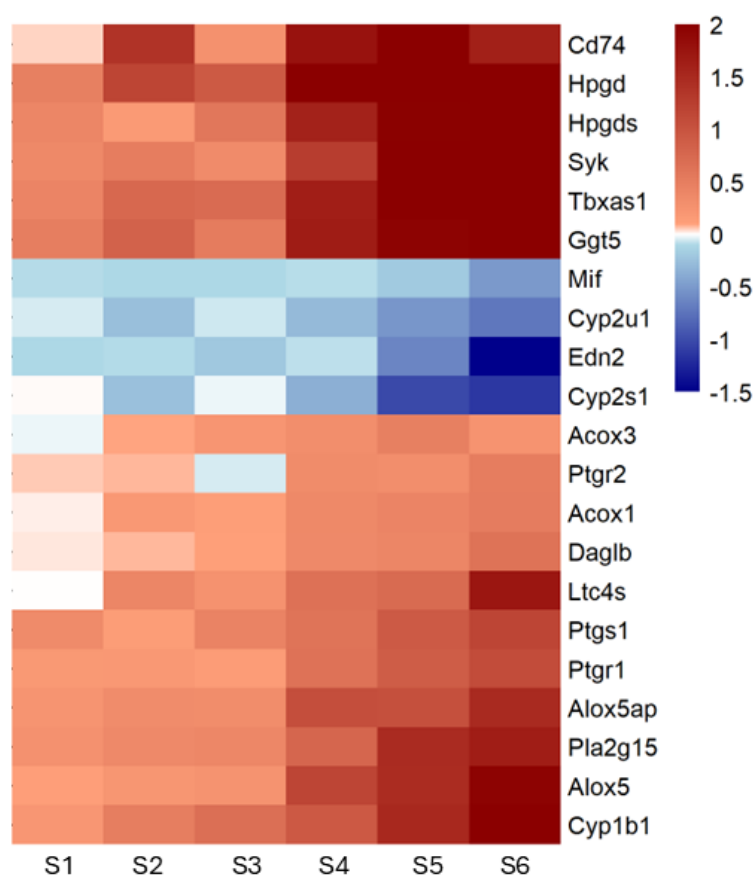


Figura R10. Comparativa de las alteraciones transcripcionales en las vías metabólicas de eicosanoides en la médula espinal de ratones *SOD1* en estadios sintomáticos tempranos y avanzados. Mapa de calor que combina seis estudios transcriptómicos (S1-3: estadio sintomático temprano y S4-6: estadio sintomático avanzado), mostrando los niveles de expresión de los principales genes que participan en las vías metabólicas de los eicosanoides. Los colores del mapa de calor representan los niveles de expresión según los valores del $\log_2\text{Foldchange}$. Cada columna corresponde a un estudio individual de RNA-seq y cada fila a un gen.

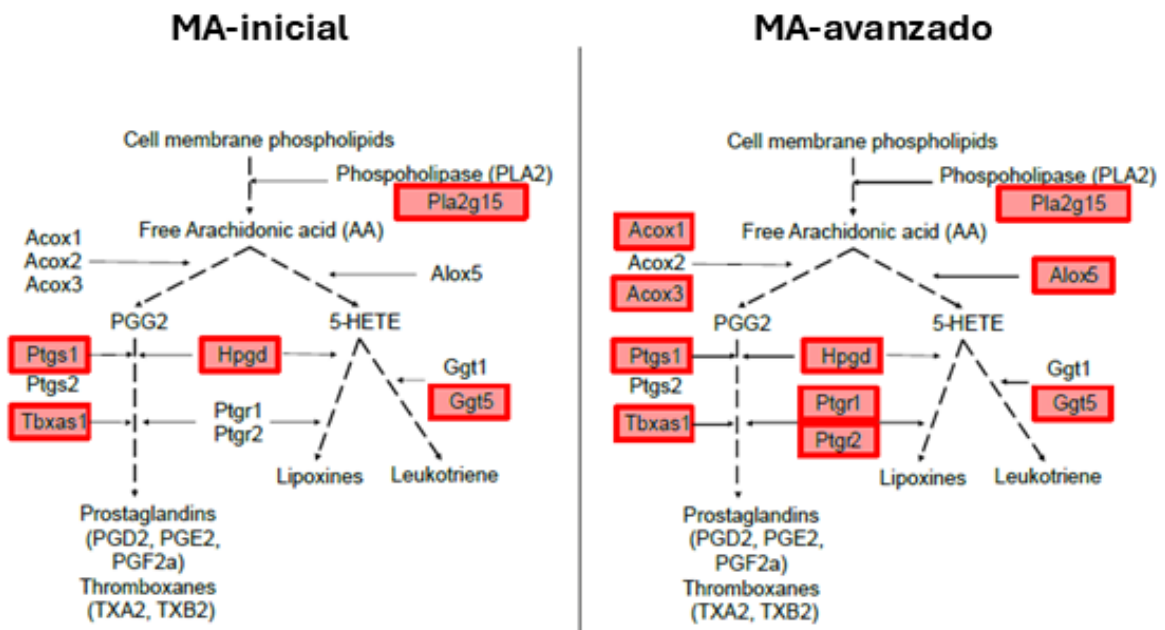


Figura R11. Esquematación de la ruta de síntesis de eicosanoides comparando los resultados del MA-inicial y avanzado. Los genes coloreados indican que han sido identificados en el meta-análisis como alterados: en rojo si están sobreexpresados y en azul si están reprimidos (en este caso no se identificaron como reprimidos ninguno de los genes representados).

1.3.3 Metabolismo del colesterol

El metabolismo del colesterol en el sistema nervioso central (SNC) es fundamental para la formación y el mantenimiento de las membranas celulares y la mielina. Debido a la presencia de la barrera hematoencefálica, el SNC sintetiza y regula su propio colesterol de manera independiente (para una explicación detallada consultar la sección de la Introducción *2.3 Metabolismo del colesterol*).

Para evaluar los niveles de expresión génica en estadios iniciales y tardíos de la enfermedad, se construyó un *heatmap* que incluyó los genes del metabolismo del colesterol detectados en el MA-inicial, junto con los principales genes involucrados en los procesos de síntesis, transporte y almacenamiento. Este análisis reveló dos grupos de genes claramente diferenciados (Figura R13). El primer grupo mostró una leve represión en los estadios iniciales, que se intensificó en los estadios tardíos. La mayoría de estos genes están implicados en la biosíntesis del colesterol. Aunque el MA-inicial ya había detectado la desregulación de genes implicados en la síntesis como *Sqle*, *Dhcr7* y *Dhcr24*, el *heatmap* permitió observar que *Srebf2*, el “*master regulator*” transcripcional del metabolismo del colesterol, comienza a

estar inhibido desde p90. De igual forma, *Hmgcr*, que cataliza el paso limitante en la síntesis de colesterol, también se encuentra reprimido desde ese mismo estadio inicial.

El segundo grupo de genes mostró un patrón opuesto, con una sobreexpresión progresiva desde p90 hasta los estadios avanzados. Muchos de estos genes están relacionados con el transporte y almacenamiento de colesterol, como *ApoE*, *Abca1*, *Ch25h*, *Idol*, *Soat1* y *Plin2*, entre otros.

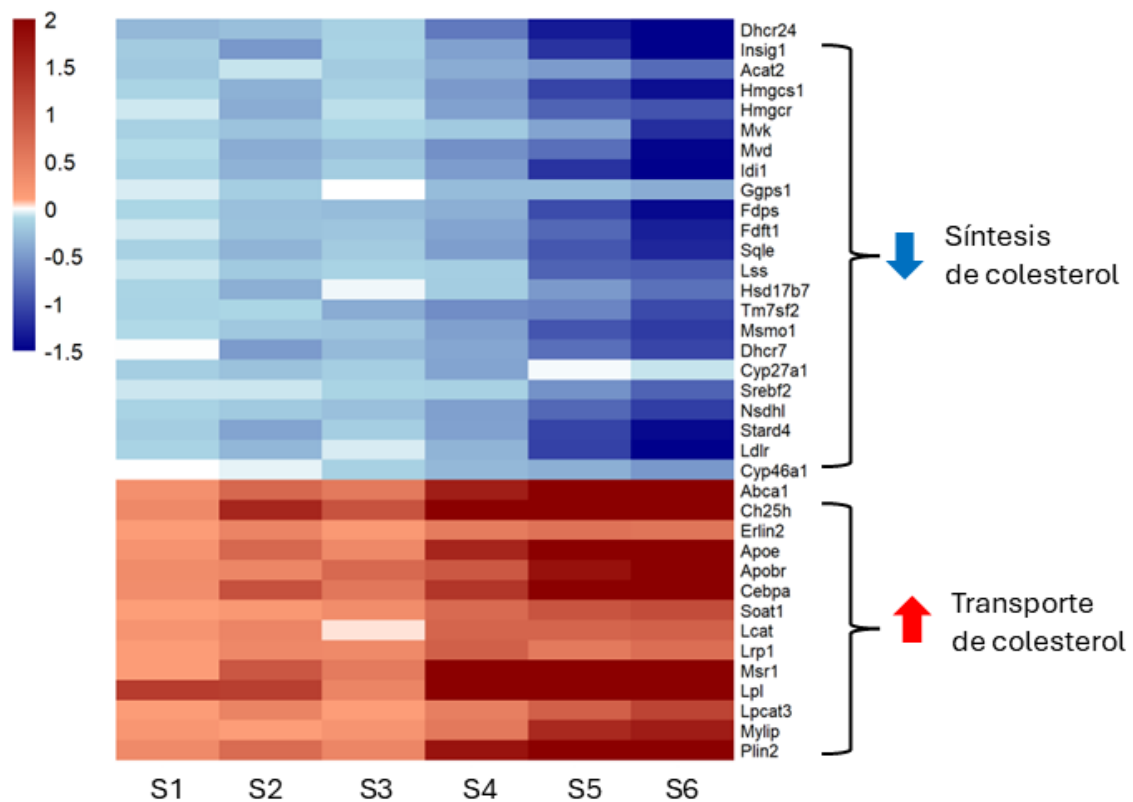


Figura R13. Comparativa de las alteraciones transcripcionales en el metabolismo del colesterol en la médula espinal de ratones *SOD1* en estadios sintomáticos tempranos y avanzados. Mapa de calor que combina seis estudios transcritómicos (S1-3: estadio sintomático temprano y S4-6: estadio sintomático avanzado), mostrando los niveles de expresión de genes que participan en el metabolismo del colesterol. Los colores del mapa de calor representan los niveles de expresión según los valores del $\log_2\text{Foldchange}$. Cada columna corresponde a un estudio individual de RNA-seq y cada fila a un gen.

Para confirmar que los genes asociados a la biosíntesis de colesterol se reprimen mientras que los involucrados en el transporte se sobreexpresan progresivamente durante el desarrollo de la patología en la médula espinal de ratones con mutación en *SOD1*, se elaboraron dos gráficos. El primero representó los valores de fold-change de todas las enzimas que participan directamente en la biosíntesis del

colesterol (Figura R14 A), y el segundo incluyó los principales genes involucrados en el transporte de colesterol (Figura R14 B). Estos gráficos mostraron cómo todas las enzimas implicadas en la biosíntesis del colesterol presentaban valores negativos de *fold-change* desde p90 (verde), con una inhibición que se intensifica a p120 (naranja) y p150 (rojo). En contraste, los genes relacionados con el transporte de colesterol tendían a presentar valores positivos de *fold-change* desde p90 (verde), los cuales aumentaban progresivamente en p120 (naranja) y p150 (rojo).

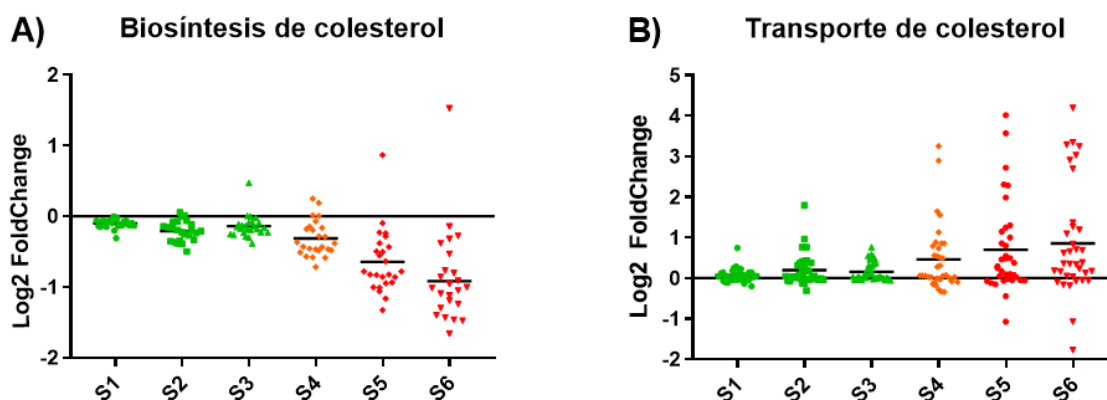


Figura R14. Gráfico de los valores de *fold-change* que tienen los genes relacionados con **A) Biosíntesis de colesterol, B) Transporte de colesterol** en los distintos estudios de RNA-seq analizados. En verde los estudios realizados a p90 (S1-3), en naranja el estudio S4 que fue realizado a p120 y en rojo los estudios realizados a p150 (S5-6). Cada punto corresponde a un gen.

1.4 Validación de las alteraciones del metabolismo del colesterol en la médula espinal del ratón hSOD1^{G93A}

Los resultados anteriores mostraron que las rutas del metabolismo de esfingolípidos, eicosanoides y colesterol están alteradas desde las fases iniciales en la médula espinal del ratón hSOD1^{G93A}. Entre ellas, la desregulación del metabolismo del colesterol fue especialmente llamativa, debido a los numerosos estudios en pacientes con ELA que han reportado alteraciones en los niveles de colesterol, como un incremento de los niveles de LDL en sangre¹³⁵, una disminución del colesterol en líquido cefalorraquídeo¹³¹ o la acumulación de ésteres de colesterol en la médula espinal¹²⁶.

Dado el especial interés en el metabolismo del colesterol, se decidió realizar validaciones adicionales de los resultados obtenidos en el meta-análisis. Para ello, se llevaron a cabo análisis por qPCR en muestras de médula espinal lumbar de

ratones distintos a los utilizados en el estudio de RNA-seq, tanto en p90 como en p120. Dentro del metabolismo del colesterol, se decidió analizar específicamente los procesos de biosíntesis, transporte y almacenamiento.

1.4.1 Estudio de la biosíntesis de colesterol en la médula espinal del ratón hSOD1^{G93A}

En el sistema nervioso central, la biosíntesis de colesterol ocurre de forma local, ya que el colesterol no puede atravesar la barrera hematoencefálica en cantidades significativas. Las principales productoras de colesterol son las células gliales, que lo sintetizan a partir de acetil-CoA. La ruta de síntesis de colesterol desde acetil-CoA implica más de veinte enzimas y puede dividirse en tres fases: una fase temprana (conversión de acetil-CoA a mevalonato), una fase intermedia (conversión de mevalonato a escualeno) y una fase tardía (conversión de escualeno a colesterol).

Para las validaciones mediante qPCR, se seleccionaron dos genes representativos por fase: *Acat2* y *Hmgcr* para la fase temprana; *Mvk* y *Sqle* para la fase intermedia; y *Dhcr7* y *Dhcr24* para la fase tardía (Figura R15). Aunque tres genes (*Mvk*, *Dhcr7* y *Dhcr24*) mostraron una tendencia a estar levemente reprimidos en la etapa inicial de la patología (p90), solo *Dhcr7* presentó una diferencia estadísticamente significativa (*Dhcr7*-p90: WT=1,00, SOD1^{G93A}=0,78, p-val=0,038). Esta baja detección de diferencias podría explicarse por una represión demasiado sutil al inicio de la enfermedad, que técnicas menos sensibles como la qPCR (en comparación con el RNA-seq) no logran detectar. Esto concuerda con los valores observados en el estudio 1 de RNA-seq, donde los seis genes mostraron valores negativos de log₂Fold-change pequeños, en un rango de aproximadamente de -0.02 a -0.3. *p*

En el estadio sintomático de la enfermedad (p120), los seis genes analizados mostraron una tendencia clara a la inhibición, y cuatro de ellos (*Acat2*, *Mvk*, *Dhcr7* y *Dhcr24*) lo hicieron de forma estadísticamente significativa (*Acat2*-p120: WT=1,00, SOD1^{G93A}=0,53, p-val=0,0002; *Mvk*-p120: WT=1,00 SOD1^{G93A}=0,59, p-val=0,0049; *Dhcr7*-p120: WT=1,00, SOD1^{G93A}=0,71, p-val=0,0091; *Dhcr24*-p120: WT=1,00, SOD1^{G93A}=0,42, p-val=0,0011) (Figura R15).

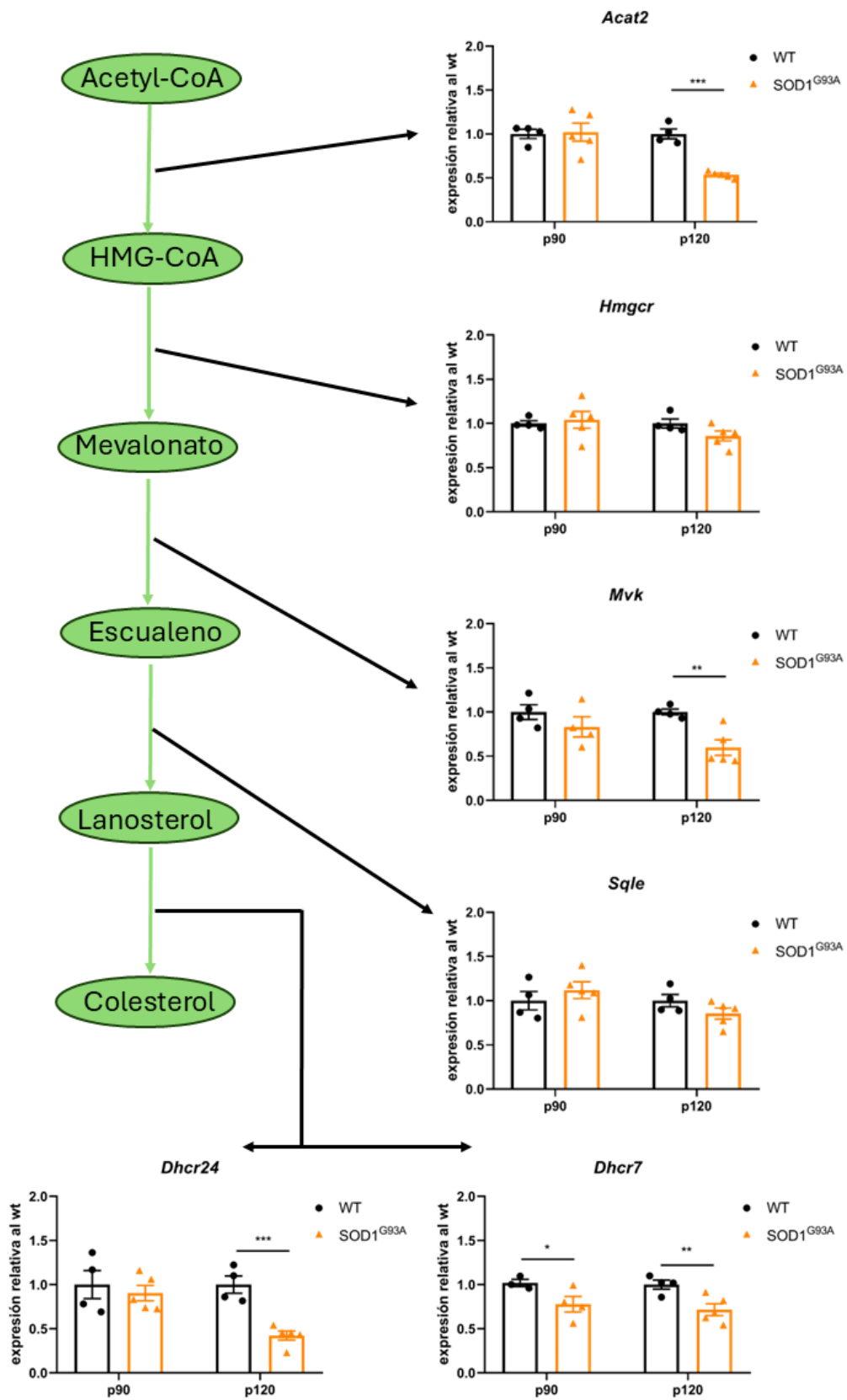


Figura R15. Niveles de expresión de genes involucrados en la biosíntesis de colesterol analizados mediante qPCR en la región lumbar de la médula espinal de hembras WT y hSOD1^{G93A} en diferentes etapas de la enfermedad: a los 90 días (WT n = 4, hSOD1^{G93A} n = 5) y a los 120 días de edad (WT n = 4, hSOD1^{G93A} n = 5). Los valores se expresan en relación con el grupo WT. Los datos se representan como la media ± error estándar de la media (SEM). p < 0,05 (*), p < 0,01 (**), p < 0,001 (***).

Dentro de los distintos mecanismos que regulan la biosíntesis de colesterol, el factor de transcripción SREBP2 (cuyo gen es denominado *Srebf2*) es considerado el “*master regulator*”. Cuando los niveles intracelulares de colesterol son adecuados, SREBP2 permanece retenido en el retículo endoplasmático, “secuestrado” por INSIG1 y SCAP. Sin embargo, cuando los niveles de colesterol disminuyen, SREBP2 es transportado al aparato de Golgi, donde se activa por proteólisis. Una vez activado, su fragmento N-terminal se transloca al núcleo, donde se une a las regiones promotoras de genes clave en la síntesis de colesterol, promoviendo así la transcripción de sus genes diana (Figura R16 A).

Dada la importancia de este factor de transcripción en la regulación de la biosíntesis de colesterol, se decidió medir sus niveles tanto de ARN como de proteína en la médula espinal lumbar de ratones hSOD1^{G93A}, en dos estadios de la enfermedad: p90 (inicio) y p120 (fase sintomática).

Los niveles de ARN mensajero (ARNm) de *Srebf2*, medidos mediante qPCR, revelaron una leve reducción de su expresión tanto en p90 como en p120, aunque sin alcanzar significación estadística en ninguna de las dos etapas (Figura R16 B). Sin embargo, dado que la activación de *Srebp2* ocurre mediante proteólisis del fragmento N-terminal, los niveles de ARNm no tienen por qué reflejar necesariamente los cambios funcionales de este factor. Por ello, se evaluaron los niveles de proteína del fragmento N-terminal de *Srebp2*, el que se transloca al núcleo y activa la transcripción, mediante Western blot. A p90, se observó una reducción media del 25% en los niveles del *Srebp2* nuclear; sin embargo, debido a una alta variabilidad entre muestras, esta disminución no fue estadísticamente significativa (Figura R16 C). A p120 los niveles de *Srebp2* nuclear disminuían de manera significativa casi un 40% de media (*Srebp2*n-p120: WT=1,00, SOD1^{G93A}=0,63, p-val=0,0347) (Figura R16 D).

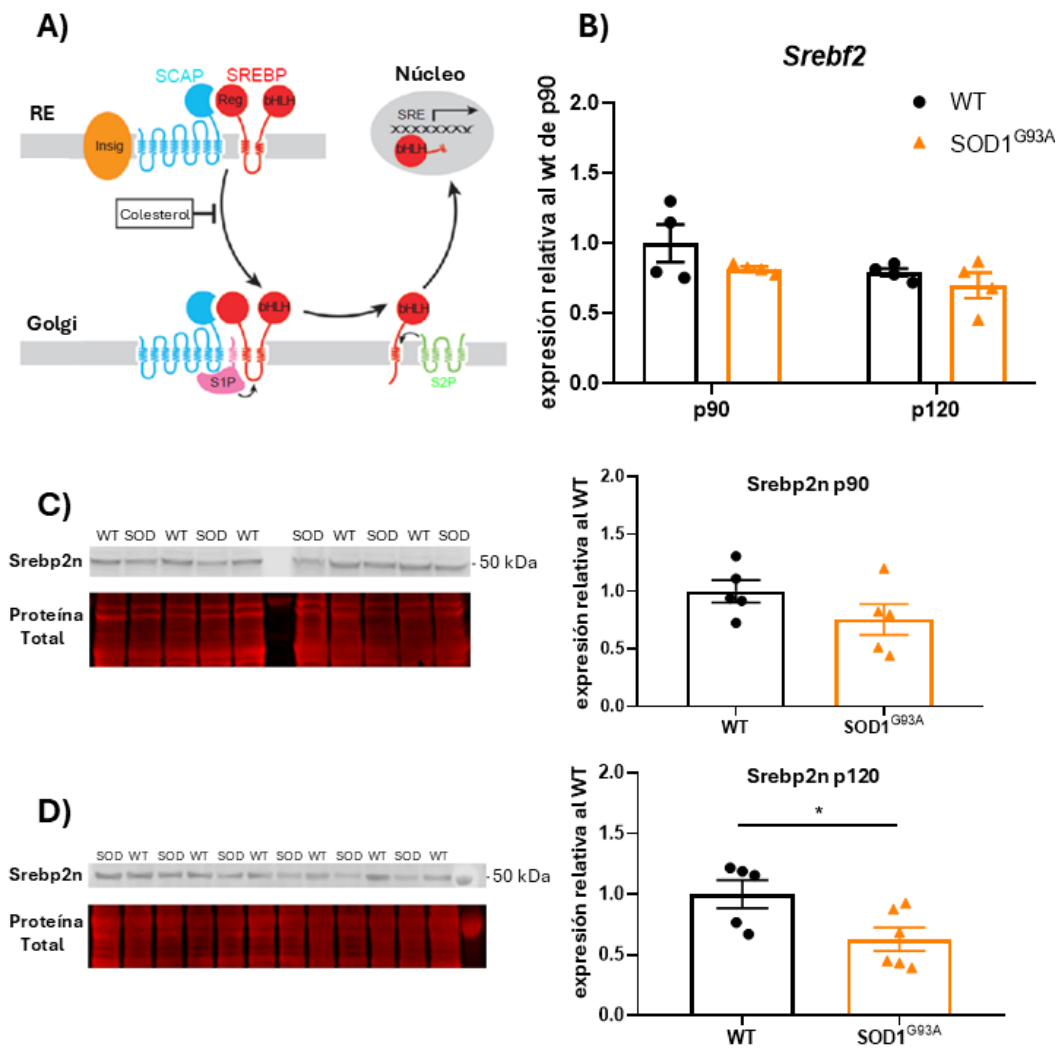


Figura R16. Estudio de la expresión génica y proteica de *Srebf2*/*Sbrep2* en la médula espinal de ratones hembra *hSOD1^{G93A}*. A) Representación del mecanismo de activación de *Sbrep2* para que se transporte al núcleo y actúe como factor de transcripción de genes involucrados en la biosíntesis de colesterol. B) Medida del nivel de expresión del gen *Srebf2* a p90 (WT n = 4, *hSOD1^{G93A}* n = 4) y p120 (WT n = 4, *hSOD1^{G93A}* n = 4). C) Cuantificación de la expresión proteica del fragmento nuclear de *Sbrep2* (*Srebp2n*) mediante *western-blot* a p90 (WT n = 5, *hSOD1^{G93A}* n = 5) y D) a p120 (WT n = 5, *hSOD1^{G93A}* n = 5). Los datos se representan como la media ± error estándar de la media (SEM). $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)

1.4.2 Estudio del transporte del colesterol en la médula espinal del ratón hSOD1^{G93A}

El principal tipo celular encargado de la síntesis de colesterol en el sistema nervioso central adulto es el astrocito. Sin embargo, otros tipos celulares como las neuronas requieren niveles adecuados de colesterol para mantener su integridad y funcionalidad celular. Por ello, el transporte de colesterol desde los astrocitos hacia otros tipos celulares en el SNC es un proceso fundamental. Este proceso se puede dividir en dos etapas:

1. Exportación astrocitaria: El astrocito empaqueta el colesterol sintetizado en lipoproteínas y las libera al espacio extracelular. Para formar estas lipoproteínas, se requiere la síntesis de APOE, que se une al colesterol libre y a otros lípidos. La transferencia de colesterol y lípidos a APOE es mediada por transportadores de membrana, entre los que destacan ABCA1 y ABCG1. Además, la enzima LCAT esterifica el colesterol dentro de las lipoproteínas, aumentando su estabilidad y facilitando su transporte.
2. Captación neuronal: Las neuronas u otras células captan estas lipoproteínas principalmente a través del receptor LDLR (receptor de lipoproteínas de baja densidad), que las internaliza mediante endocitosis para su procesamiento en lisosomas. La eficiencia de esta captación está regulada en gran medida por los niveles de LDLR en la membrana neuronal, los cuales dependen parcialmente de la expresión de IDOL. IDOL es una ubiquitina ligasa que promueve la degradación lisosomal de LDLR, modulando así la cantidad de colesterol que puede ser internalizado.

Aunque el transporte de colesterol es un proceso más complejo de lo aquí descrito e implica la participación de muchas más proteínas, se decidió evaluar la expresión de los seis genes previamente mencionados para validar la desregulación observada en los meta-análisis (Figura R17). A p90, se observó que cuatro de estos genes estaban sobreexpresados de forma estadísticamente significativa (*Abca1*-p90: WT=1,00, SOD1^{G93A}=1,78, p-val=0,0009; *Abcg1*-p90: WT=1,00 SOD1^{G93A}=1,24, p-val=0,0373; *Lcat*-p90: WT=1,00, SOD1^{G93A}=1,14, p-val=0,0485; *Idol*-p90: WT=1,00, SOD1^{G93A}=2,12, p-val=0,0020). A p120, cinco genes mantenían o incluso aumentaban la sobreexpresión observada al inicio de la patología (*Abca1*-p120: WT=1,01, SOD1^{G93A}=1,89, p-val=0,0010; *ApoE*-p120: WT=1,00 SOD1^{G93A}=1,76, p-val=0,0001; *Lcat*-p120: WT=1,00, SOD1^{G93A}=1,66, p-val= <0,0001; *Idol*-p120: WT=1,00, SOD1^{G93A}=2,16, p-val=0,0016; *Ldlr*-p120: WT=1,00, SOD1^{G93A}=0,69, p-val=0,0144). Estos resultados sugieren que desde las etapas iniciales de la enfermedad en la médula espinal se produce un aumento de la exportación de colesterol por parte de los astrocitos. De forma destacada, en el estadio

sintomático, los niveles de expresión de *Ldlr* se reducen de manera significativa. Esta disminución transcripcional, sumada a la sobreexpresión de *Idol*, que favorece la degradación del receptor LDLR, sugiere que la captación neuronal de colesterol se encuentra comprometida desde p90, y particularmente afectada en p120 (Figura R18).

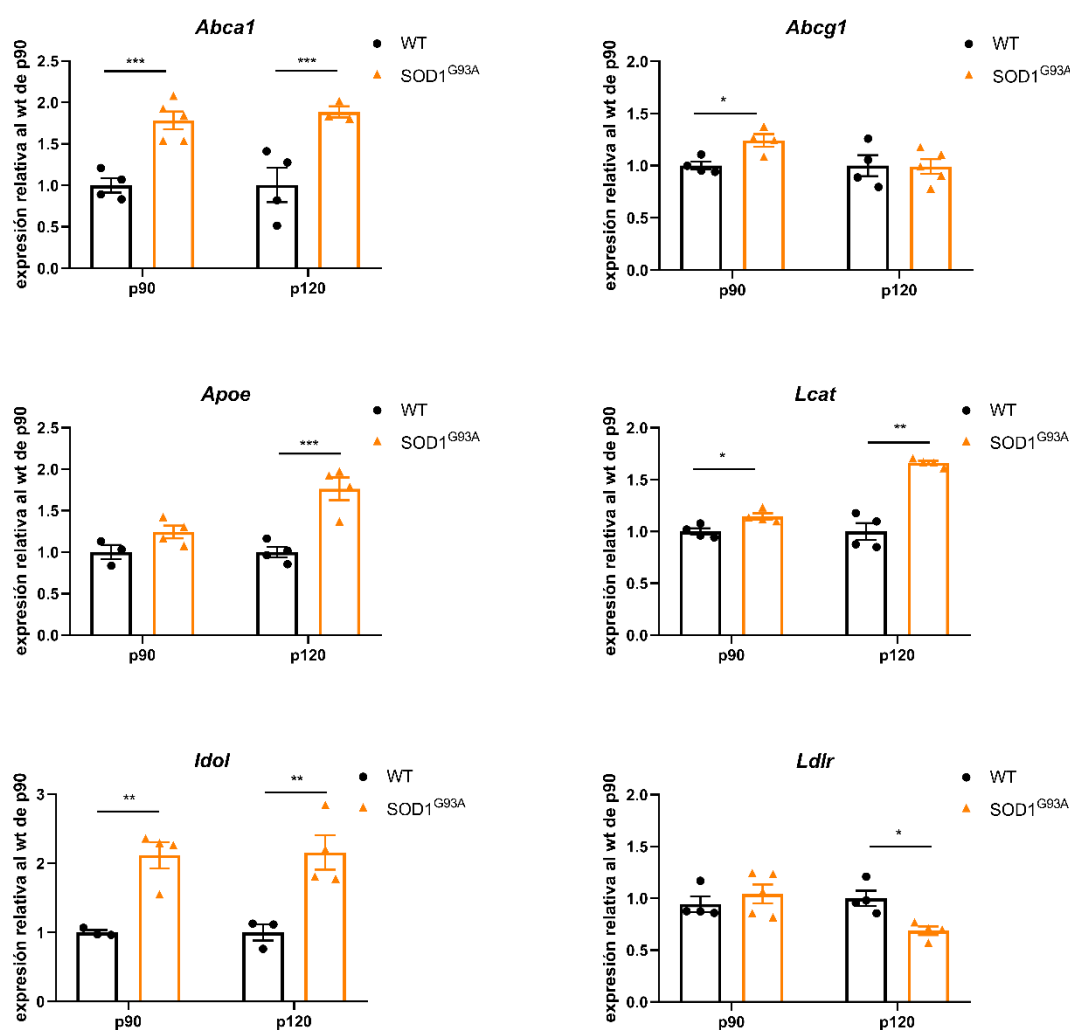


Figura R17. Niveles de expresión de genes relacionados con el transporte de colesterol analizados mediante qPCR en la región lumbar de la médula espinal de hembras WT y hSOD1^{G93A} en diferentes etapas de la enfermedad: a los 90 días (WT n = 3-4, hSOD1^{G93A} n = 4-5) y a los 120 días de edad (WT n = 4, hSOD1^{G93A} n = 3-5). Los valores se expresan en relación con el grupo WT de p90. Los datos se representan como la media ± error estándar de la media (SEM). p < 0,05 (*), p < 0,01 (**), p < 0,001 (***).

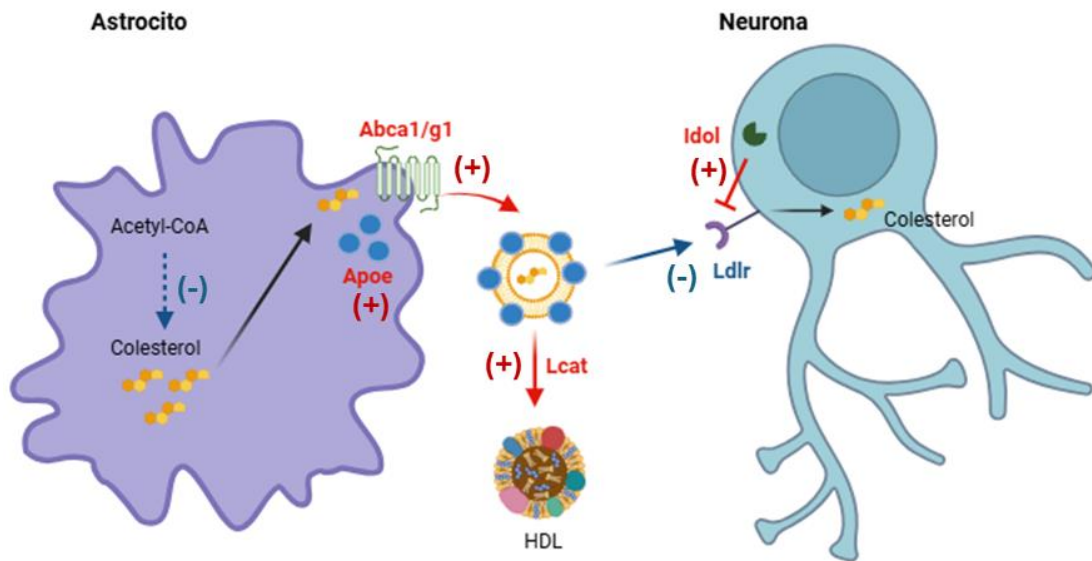


Figura R18. Esquema representando la interpretación realizada de las alteraciones transcriptómicas identificadas en los procesos de biosíntesis y transporte de colesterol en la médula espinal del modelo murino *hSOD1^{G93A}*. La biosíntesis de colesterol estaría disminuida en los astrocitos mientras que su unión a lipoproteínas mediante Apoe y su exportación al medio extracelular mediante Abca1 o Abcg1 estaría aumentada. Estas lipoproteínas que contienen el colesterol estarían viendo disminuida su captación por neuronas mediante receptores Ldlr. Esta disminución de receptores Ldlr estaría favorecida por un incremento en Idol que es una proteína que provoca la degradación de los receptores Ldlr. Por último, la maduración de las lipoproteínas a HDL estaría incrementada por la acción de la enzima Lcat. Figura creada con Biorender.com

1.4.3 Estudio del procesamiento del colesterol en la médula espinal del ratón *hSOD1^{G93A}*

Dado que el colesterol no puede degradarse directamente, su exceso se convierte en oxisteroles o ésteres de colesterol cuando su concentración intracelular aumenta demasiado. Aunque el colesterol no puede cruzar libremente la barrera hematoencefálica, los oxisteroles, al haber perdido parte de su hidrofobicidad, sí pueden atravesarla. Algunos de los principales oxisteroles son el 24-hidroxicolesterol, el 25-hidroxicolesterol y el 27-hidroxicolesterol, por lo que se decidió medir la expresión de los genes implicados en su síntesis: *Cyp46a1*, *Ch25h* y *Cyp27a1*, respectivamente (Figura R19).

A p90 se observó un aumento significativo en la expresión del gen *Ch25h* (*Ch25h*-p90: WT = 1,27; SOD1^{G93A} = 3,42; $p = 0,0011$), lo que indica que desde estadios iniciales la producción de 25-hidroxicolesterol está incrementada. A p120, los niveles de expresión de este gen se incrementaron hasta siete veces con respecto al control (*Ch25h*-p120: WT = 1,63; SOD1^{G93A} = 11,78; $p = 0,0015$). Este aumento tan marcado sugiere que *Ch25h* podría estar desregulado desde fases presintomáticas, por lo que se decidió analizar su expresión a p60. Este análisis confirmó que el gen está sobreexpresado ya en la etapa presintomática (*Ch25h*-p60: WT = 1,00; SOD1^{G93A} = 2,01; $p = 0,0388$) (Figura R19 A). Por otro lado, el gen *Cyp46a1* no mostró alteraciones en ninguno de los estadios analizados (Figura R19 B), mientras que *Cyp27a1* presentó un descenso progresivo en su expresión desde p90, que alcanzó significancia estadística a p120 (*Cyp27a1*-p120: WT = 1,00; SOD1^{G93A} = 0,49; $p = 0,0003$), lo cual sugiere una disminución en la producción de 27-hidroxicolesterol desde las fases tempranas de la patología (Figura R19 C).

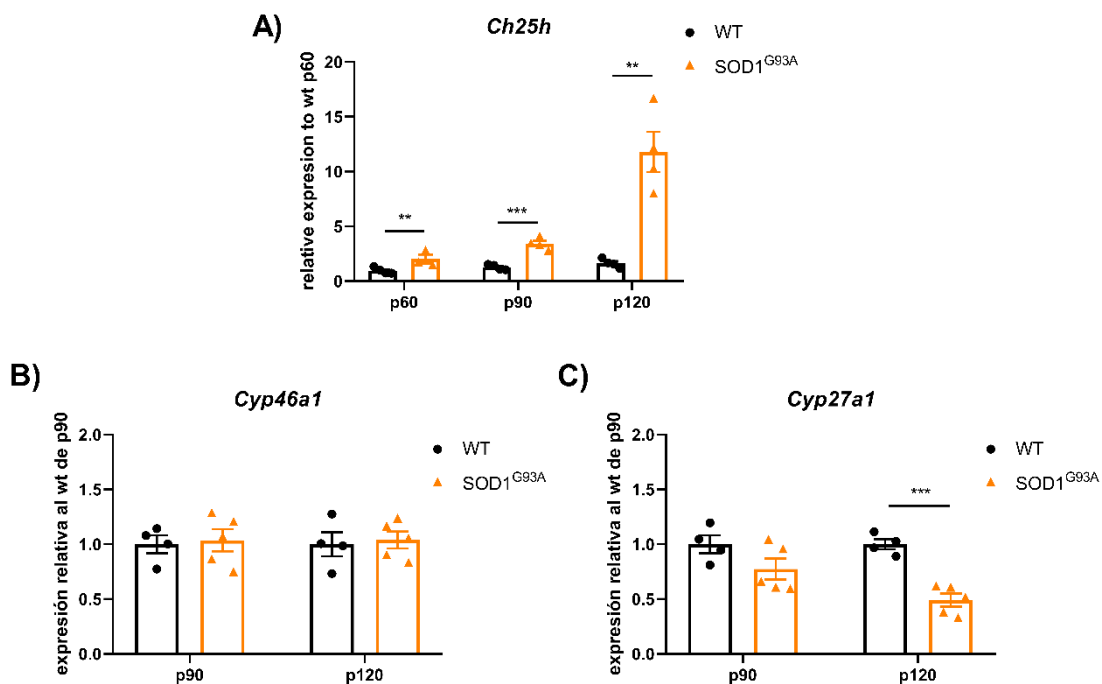


Figura R19. Niveles de expresión de los principales genes relacionados con la biosíntesis de oxisteroles analizados mediante qPCR en la región lumbar de la médula espinal de hembras WT y hSOD1^{G93A} en diferentes etapas de la enfermedad: a los 60 días solo para *Ch25h* (WT $n = 4$, hSOD1^{G93A} $n = 4$) a los 90 días (WT $n = 4$, hSOD1^{G93A} $n = 4$) a los 120 días de edad (WT $n = 4$, hSOD1^{G93A} $n = 4$). Los valores se expresan en relación con el grupo WT de p90 o p60 en el caso del *Ch25h*. Los datos se representan como la media \pm error estándar de la media (SEM). $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)

Regular los niveles de colesterol es un proceso crucial, ya que un exceso de colesterol libre puede ser citotóxico y contribuir a procesos neurodegenerativos. Para prevenir este daño, las células del sistema nervioso central (SNC) emplean mecanismos que permiten almacenar el colesterol en formas inertes, principalmente mediante su esterificación. La esterificación del colesterol está catalizada por la enzima SOAT1, que convierte el colesterol libre en ésteres de colesterol, compuestos menos tóxicos que pueden almacenarse de forma segura dentro de gotas lipídicas. Estas gotas lipídicas contienen en su interior no solo colesterol esterificado, sino también triglicéridos, sintetizados por la acción de DGAT1/2. Este núcleo lipídico está envuelto por una monocapa fosfolipídica estabilizada por proteínas de la familia de las perilipinas, como PLIN2/3. La principal enzima responsable de la degradación de estas gotas lipídicas es ATGL, que rompe los triglicéridos del núcleo.

Para comprobar si el proceso de acumulación de colesterol mediante gotas lipídicas estaba alterado en la médula espinal de los ratones hSOD1^{G93A}, se midió la expresión de los genes mencionados mediante qPCR. En primer lugar, se decidió realizar un cribado de estos genes en el estadio sintomático, para posteriormente estudiar únicamente a p90 aquellos que mostraran alteraciones a p120. Este análisis reveló que los genes *Soat1* y *Plin2* estaban sobreexpresados a p120 (*Soat1*-p120: WT = 1,00; SOD1^{G93A} = 1,97; $p = 0,0003$; *Plin2*-p120: WT = 1,00; SOD1^{G93A} = 1,78; $p = 0,0013$) (Figura R20 A). El aumento de los niveles de *Plin2* en el estadio sintomático se intentó corroborar mediante western-blot. Este análisis mostró una tendencia al aumento de los niveles proteicos de PLIN2, aunque sin alcanzar significancia estadística (PLIN2-p120: WT = 1,00; SOD1^{G93A} = 1,21; $p = 0,2238$) (Figura R20 B).

Además, se estudió la expresión génica de los dos genes desregulados a p120 en el estadio inicial mediante qPCR, sin observar alteraciones a p90 (datos no mostrados). En conjunto, estos resultados indican que al inicio de la patología en la médula espinal del ratón hSOD1^{G93A} no hay alteraciones en la acumulación de colesterol mediante gotas lipídicas, mientras que, conforme avanza la enfermedad, sí se produce un aumento en la esterificación del colesterol mediado por SOAT1. Además, este colesterol esterificado podría estar acumulándose en gotas lipídicas debido al aumento en la expresión del gen que codifica la proteína estabilizadora PLIN2 (Figura R21).

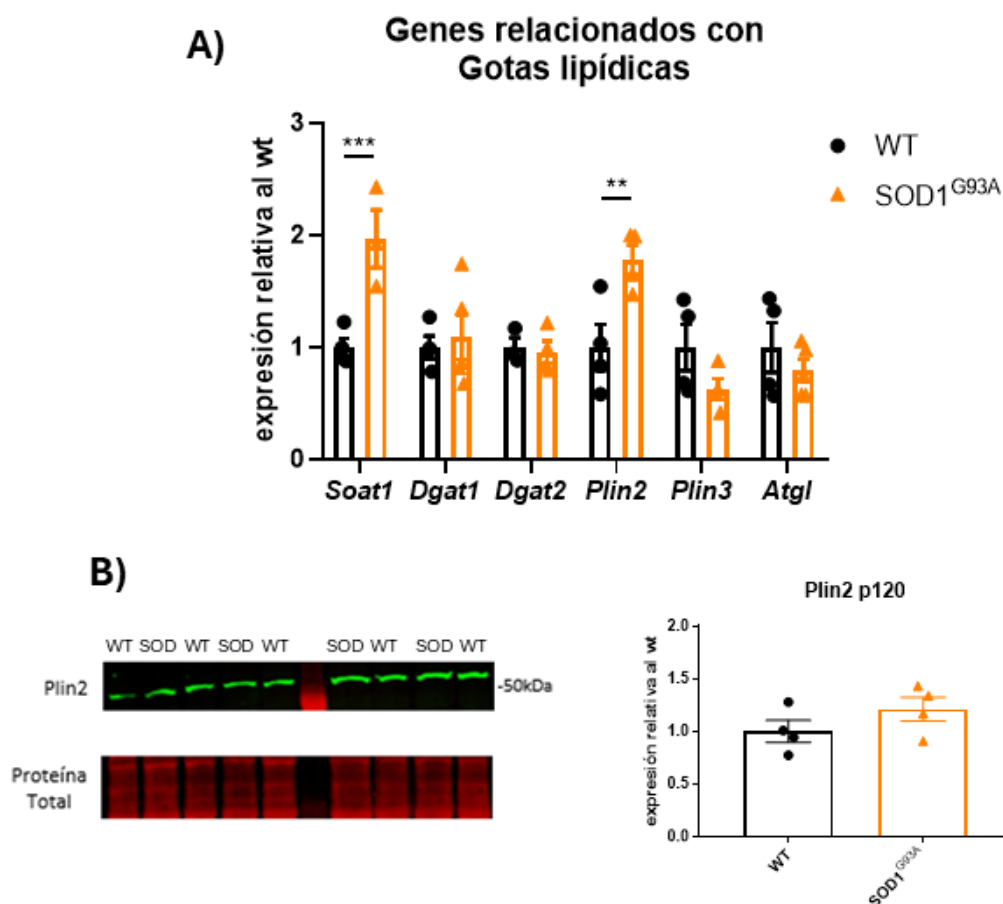


Figura R20. Estudio de la expresión génica y proteica de genes asociados a gotas lipídicas en la médula espinal de ratones hembra hSOD1^{G93A}. A) Medida del nivel de expresión de los principales genes asociados a gotas lipídicas (*Soat1*, *Dgat1*, *Dgat2*, *Plin2*, *Plin3*, *Atgl*) a p120 (WT n = 4, hSOD1^{G93A} n = 4-5). B) Cuantificación de la expresión proteica de Plin2 mediante *western-blot* a p120 (WT n = 4, hSOD1^{G93A} n = 4). Los datos se representan como la media \pm error estándar de la media (SEM). $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)

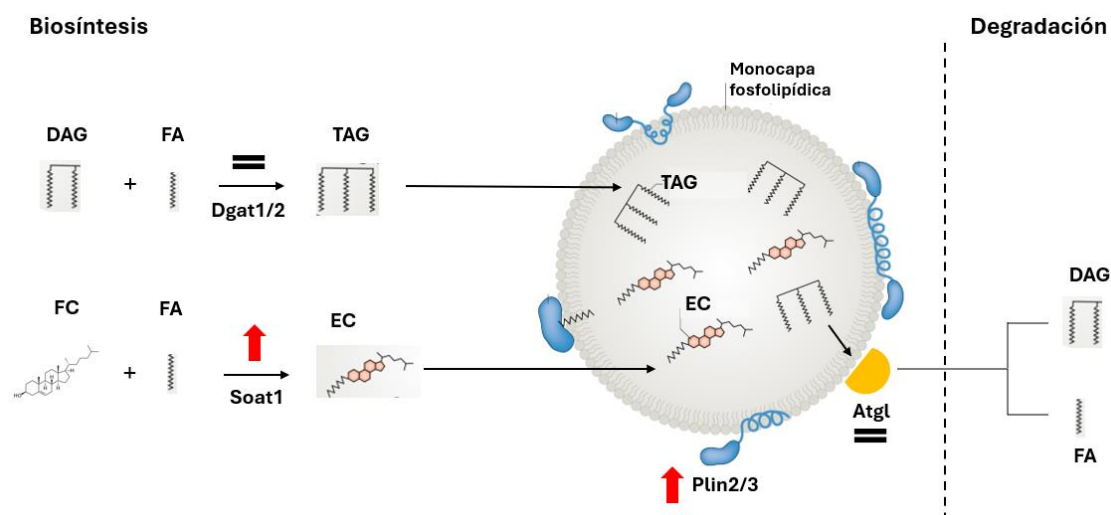


Figura R21. Esquema representando la interpretación realizada de las alteraciones transcriptómicas identificadas en los procesos asociados a la formación y degradación de gotas lipídicas en la médula del modelo murino $hSOD1^{G93A}$ en estadios avanzados. Las gotas lipídicas contienen un núcleo lipídico formado por triglicéridos y ésteres de colesterol. Los triglicéridos se sintetizan por la acción de las enzimas Dgat de las cuales no se observan alteraciones transcripcionales. Los ésteres de colesterol son formados por Soat1 cuyo gen sí que está sobreexpresado a p120. Este núcleo lipídico es estabilizado por una monocapa fosfolipídica estabilizada por diferentes proteínas entre las que destacan la familia de las perilipinas. El gen Plin2 tiene su expresión aumentada en estadios sintomáticos. La degradación de estas gotas viene mediada principalmente por Atgl cuyo gen tampoco se encuentra desregulado. Estos datos apuntan a un incremento en la formación de gotas lipídicas en los estadios avanzados de la patología. (DAG: diglicéridos, FA: ácido graso, TAG: triglicérido, FC: colesterol libre, EC: éster de colesterol).

1.5 Estudio del metabolismo del colesterol en astrocitos primarios del ratón $hSOD1^{G93A}$

Los astrocitos son el principal tipo celular encargado de sintetizar el colesterol en el SNC durante la edad adulta, y es el encargado de proporcionárselo a los demás tipos celulares. Con el objetivo de investigar si los astrocitos pudieran contribuir a las alteraciones en el metabolismo del colesterol observadas previamente en tejido de médula espinal de ratones $hSOD1^{G93A}$, se realizaron cultivos primarios de astrocitos corticales aislados de crías neonatales (p0) de ratones WT y $hSOD1^{G93A}$. Este enfoque permitió aislar posibles efectos autónomos de los astrocitos, evitando la influencia de la patología global del tejido. Una vez establecidos los cultivos y tras alcanzar la confluencia, se extrajo ARN total para analizar, mediante RT-qPCR, la expresión de genes clave involucrados en la homeostasis del colesterol.

Para estudiar la síntesis de colesterol, se analizó la expresión de *Srebf2*, *Acat2*, *Hmgcr*, *Mvk*, *Sqle*, *Dhcr7* y *Dhcr24*. En líneas generales, no se detectaron cambios significativos en la expresión de estos genes en los astrocitos derivados de ratones hSOD1^{G93A}, aunque se observó una disminución del 25 % y del 33 % en la expresión de *Dhcr7* y *Dhcr24*, respectivamente, sin alcanzar significancia estadística (*Dhcr7*-astros: WT = 1,00; SOD1^{G93A} = 0,7579; $p = 0,0970$; *Dhcr24*-astros: WT = 1,00; SOD1^{G93A} = 0,6741; $p = 0,0541$) (Figura R22 A). Para estudiar el transporte y procesamiento del colesterol, se analizó la expresión de *Abca1*, *Abcg1*, *Ch25h* y *Plin2*. Nuevamente, ninguno de estos genes mostró cambios estadísticamente significativos en su expresión, aunque se observó una tendencia a la sobreexpresión en genes como *Abcg1* y *Ch25h* (Figura R22 B).

Estos datos, en conjunto, sugieren que las alteraciones en el metabolismo del colesterol no son un mecanismo autónomo de los astrocitos inducido exclusivamente por la presencia de la mutación hSOD1^{G93A}. Aunque en cultivo estos astrocitos presentan una leve tendencia a reprimir algunos genes implicados en la síntesis de colesterol y a sobreexpresar otros relacionados con el transporte, todo apunta a que requieren la acción de otros tipos celulares que también expresen la mutación y/o la influencia del microambiente neurodegenerativo, caracterizado por estrés oxidativo y neuroinflamación, para recapitular plenamente las alteraciones en el metabolismo del colesterol.

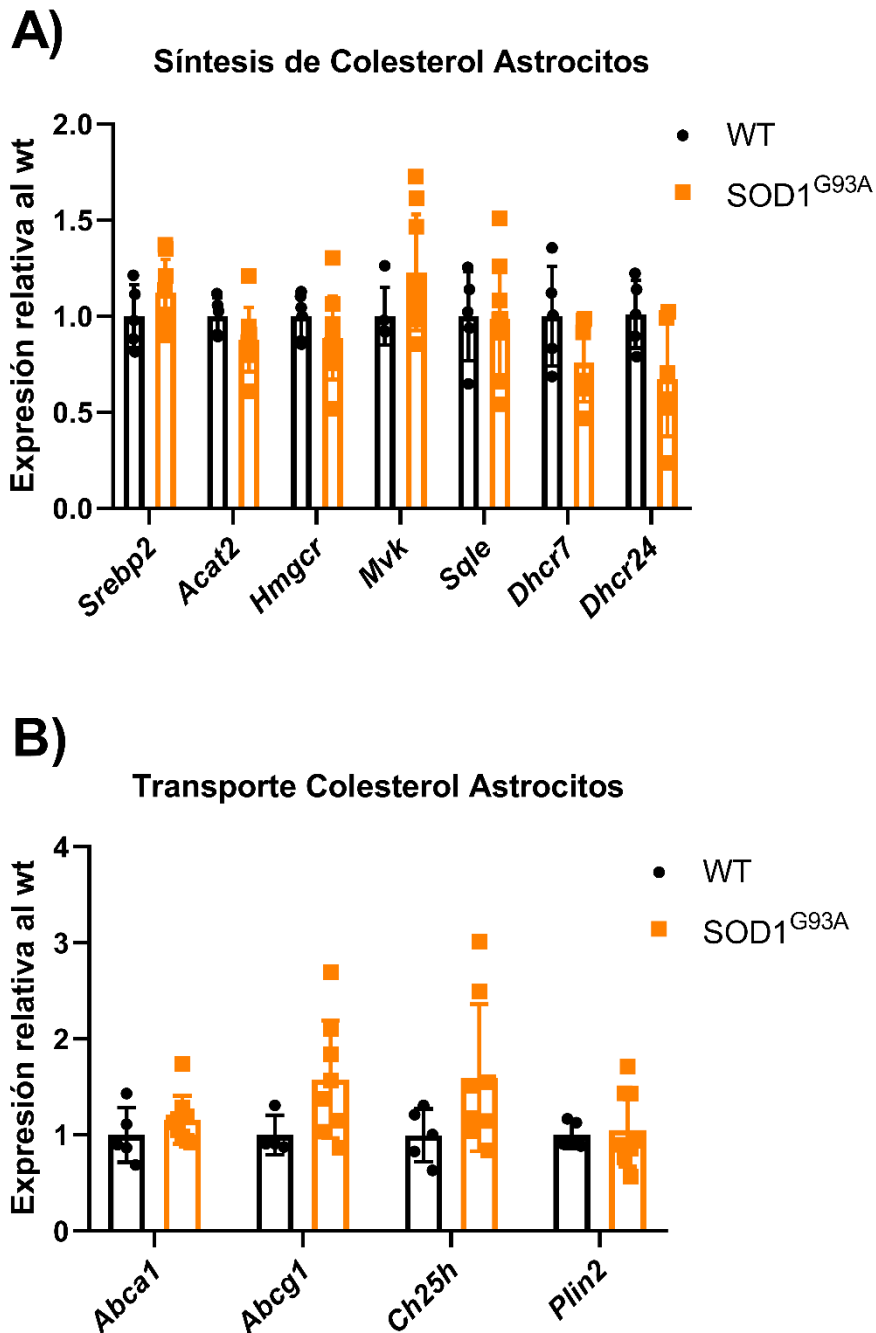


Figura R22. Niveles de expresión de genes relacionados con la biosíntesis y transporte de colesterol analizados mediante qPCR de cultivos primarios de astrocitos corticales de ratones WT y hSOD1^{G93A}. A) Se midió la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de colesterol (*Srebp2*, *Acat2*, *Hmgcr*, *Mvk*, *Sqle*, *Dhcr7*, *Dhcr24*), WT n = 5, hSOD1^{G93A} n = 6-8). B) Se midió la expresión de genes relacionados con el transporte de colesterol (*Abca1*, *Abcg1*, *Ch25h*, *Plin2*), WT n = 5, hSOD1^{G93A} n = 6-8) a los 90 días (WT n = 4, hSOD1^{G93A} n = 4) a los 120 días de edad (WT n = 5, hSOD1^{G93A} n = 8-9). Los valores se expresan en relación con el grupo WT. Los datos se representan como la media ± error estándar de la media (SEM). p < 0,05 (*), p < 0,01 (), p < 0,001 (***)**

Bloque 2. Evaluando la vía de los LXR como diana terapéutica en la ELA

El meta-análisis de estudios de RNA-seq de la médula espinal de ratones hSOD1^{G93A}, junto con las validaciones *in vivo* descritas en el Bloque 1 de resultados, ha mostrado importantes alteraciones en el metabolismo del colesterol. Los genes involucrados en la síntesis de colesterol están claramente reprimidos en los estadios avanzados de la patología, y los datos sugieren que esta inhibición comienza desde el inicio de los síntomas. De manera opuesta, los genes relacionados con el transporte de colesterol se encuentran sobreexpresados durante la progresión de la enfermedad. Esta respuesta de inhibición de la síntesis de colesterol y activación de la exportación de colesterol en ciertos contextos puede deberse a un mecanismo celular compensatorio que trata de contrarrestar un exceso intracelular de colesterol. Dicho mecanismo protector está mediado por la activación de la vía de los LXR (*Liver X Receptors*). Además, en la médula espinal del ratón hSOD1^{G93A} se observa un incremento de la expresión del gen responsable de sintetizar el 25-hidroxicolesterol desde estadios presintomáticos. Los oxisteroles, como el 25-hidroxicolesterol, son ligandos naturales de la vía de los LXR. En conjunto, estos cambios sugieren una activación moderada de la vía de señalización de los LXR en la médula espinal del ratón hSOD1^{G93A} (para revisar de manera simplificada el mecanismo de acción de los LXR ver Figura R23 o para una descripción más detallada consultar la sección de la Introducción 2.3.4)

La relevancia funcional de la activación de la vía de señalización de los LXR durante la patología aún no está clara. En un primer momento, podría plantearse como un nuevo mecanismo fisiopatológico en la ELA asociado a la disrupción del metabolismo lipídico, lo que justificaría la idea de tratar de inhibir dicha vía. Sin embargo, diversos estudios han descrito que la activación farmacológica de los LXR ejerce efectos neuroprotectores en otros modelos de enfermedades neurodegenerativas, incluyendo Alzheimer, Parkinson y esclerosis múltiple¹⁶¹. Estas evidencias permiten plantear la hipótesis de que la activación de LXR en la médula espinal de los ratones hSOD1^{G93A} podría constituir un mecanismo adaptativo que protege frente a la disrupción lipídica, y que potenciar esta vía podría representar una nueva diana terapéutica en la ELA.

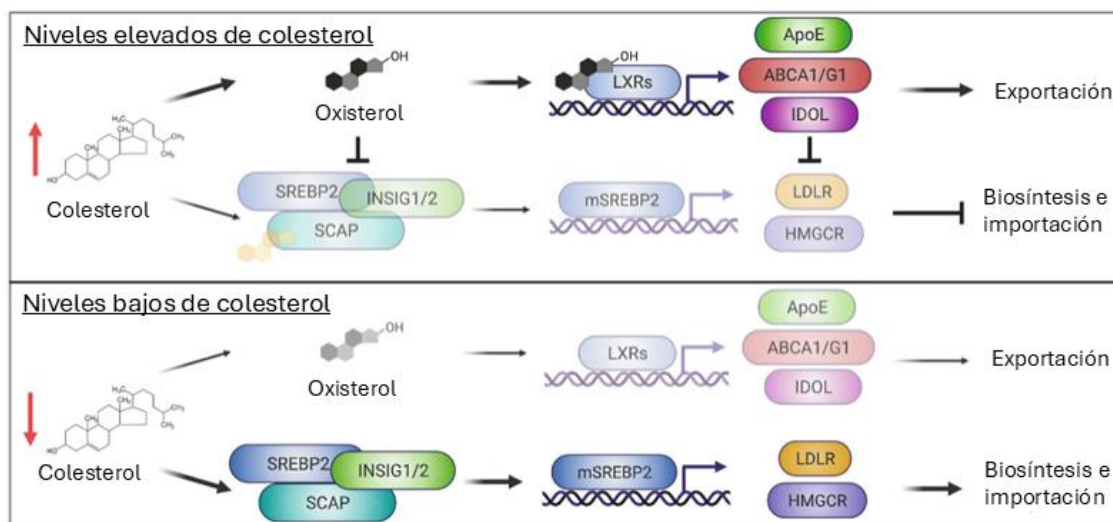


Figura R23. Esquema que muestra como la vía de señalización de los LXR responde ante un aumento de los niveles intracelulares de colesterol.

2.1 Diseño experimental y prueba piloto de la activación farmacológica de la vía de los LXR en el ratón hSOD1^{G93A}

A partir de esta hipótesis, nos propusimos evaluar los efectos de potenciar farmacológicamente esta vía mediante el uso de agonistas específicos de los LXR. Para determinar que diseño experimental era el más adecuado se comenzó realizando una revisión bibliográfica de estudios previos en otras enfermedades neurodegenerativas que hubiera utilizado los LXR como diana farmacológica. Los parámetros experimentales que se evaluaron fueron: a) ¿qué agonista farmacológico fue el seleccionado? b) ¿Qué tipo de administración se usó? (sonda oral, dieta, inyecciones intraperitoneales, etc..) c) ¿Qué dosis? d) ¿Duración del tratamiento? La tabla R2 resume las principales características de los estudios revisados:

Modelo murino	Agonista	Administración	Dosis	Duración	Ref
AZ (APP23)	T0901317	Sonda oral	50 mg/kg/día	6 días	162
AZ (Tg2567)	T0901317	Sonda oral	30 mg/kg/día	30 días	163
EAE (MOG35-55)	T0901317	Sonda oral	25 mg/kg/día	15 días	164
AZ (APPSLxPS1)	T0901317	Dieta	30mg/kg/día	60 días	165
AZ (APP23)	T0901317	Dieta	25mg/kg/día	50 días	166
AZ (APP23)	T0901317	Dieta	25mg/kg/día	120 días	167
AZ (APP/PS1ΔE9)	T0901317	Dieta	20mg/kg/día	30 días	168
EAE (MOG35-55)	T0901317	Inyección intraperitoneal	25mg/kg/día	40 días	169
EAE (MOG35-55)	T0901317	Inyección intraperitoneal	25mg/kg/día	20 días	170
EAE (MOG35-55)	GW3965	Sonda oral	20mg/kg/día	15 días	164
Abca1 KO	GW3965	Sonda oral	25mg/kg/día	9 días	171
PK (MPTP)	GW3965	Inyección subcutánea	20mg/kg/día	7 días	172
Ratas diabéticas	GW3965	Inyección subcutánea	50mg/kg/día	1día/semana durante 4 semanas	173

AZ (APPSLxPS1)	GW3965	Dieta	33mg/kg/día	56 días	174
TBI	GW3965	Dieta	15 mg/kg/día	14 días	175
AZ (3xTg-AD)	GW3965	Inyección intraperitoneal	25 mg/kg/día	2 días/semana durante 12 semanas	176
Depresión	GW3965	Inyección intraperitoneal	10 mg/kg/día	30 días	177

Tabla R2. Resumen de las características experimentales del tratamiento con agonistas de los LXR en ratones en los 17 estudios consultados para determinar el diseño experimental más adecuado en este trabajo.

Con base en los 17 estudios previos que emplearon agonistas de LXR en modelos murinos, definimos los parámetros de nuestro diseño experimental:

En primer lugar, se identificaron dos compuestos como los principalmente usados en este tipo de estudios: T0901317 (T0) y GW3965 (GW). T0 mostró una mayor potencia de activación de LXR β (la isoforma predominante en el sistema nervioso central) que GW; además, T0 también activa LXR α (la isoforma más abundante a nivel sistémico) mientras que GW presenta afinidad reducida por ésta. Ambos compuestos exhiben efectos off-target: T0 activa receptores FXR (*Farnesoide X receptor*) y GW activa receptores PXR (*Pregnane X Receptors*), si bien la actividad off-target de GW es menos pronunciada. Finalmente, T0 resultó significativamente más económico. Por todo ello, seleccionamos T0901317 como el agonista de elección, priorizando su mayor potencia y menor coste para poder incluir en el estudio tanto hembras como machos.

En cuanto al tipo de administración se optó por incorporar el compuesto T0 directamente en la dieta frente a las otras opciones como la sonda oral o las inyecciones intraperitoneales/subcutáneas. Esta vía de suministro resulta más sencilla desde el punto de vista técnico, minimiza el estrés de los animales y asegura una exposición continua y homogénea al fármaco durante todo el tratamiento. En trabajos previos, las dosis oscilaban entre 15 y 33 mg/kg/día; en este estudio se optó por 35 mg/kg/día para potenciar la respuesta terapéutica. Asimismo, se decidió realizar un tratamiento de larga duración, en línea con estudios que han administrado T0 hasta por 120 días sin evidenciar efectos adversos. Como punto de partida, se inició la administración en ratones de 60 días de edad (p60), con el objetivo de intervenir en la fase presintomática. El tratamiento

se mantuvo de por vida, permitiéndonos evaluar sus efectos en las etapas inicial, avanzada y terminal de la enfermedad.

El resumen del diseño experimental se presenta gráficamente en la Figura R24. En este experimento, los ratones se dividieron en cuatro grupos experimentales:

- WT-Ct: ratones *wild-type* alimentados con una dieta control,
- WT-T0: ratones *wild-type* alimentados con una dieta de igual composición a la control, pero suplementada con el compuesto T0901317,
- SOD1-Ct: ratones hSOD1^{G93A} alimentados con la dieta control,
- SOD1-T0: ratones hSOD1^{G93A} alimentados con la dieta suplementada con T0901317.

Este diseño experimental se llevó a cabo en hembras, con una n de 14 animales por grupo (este tamaño muestral ha demostrado en trabajos previos con este modelo aportar suficiente significancia estadística para los estudios de supervivencia). En paralelo, se replicó el mismo diseño experimental en machos con una n de 8 animales por grupo, con el objetivo de corroborar que los efectos fueran similares entre sexos. En la Figura R24 queda graficado el diseño experimental:

Diseño experimental

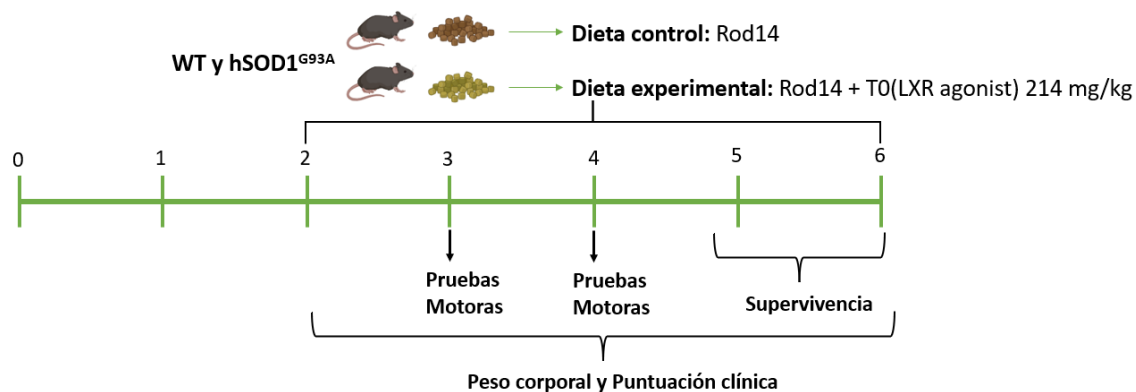


Figura R24. Línea temporal mostrando el diseño experimental elegido para tratar con agonistas de los LXR a ratones hSOD1^{G93A} y sus controles. N experimental: Wt-hembras= 14; hSOD1^{G93A}-hembras=14; Wt-machos= 8; hSOD1^{G93A}-machos=8. El tratamiento comenzó a p60 con una dosis ingerida estimada de 35mg/kg/día y se extendió hasta que los ratones hSOD1^{G93A} alcanzaron el criterio ético de punto final. Los ratones se pesaron y se les realizó una escala neurológica semanalmente. A los 90 y 120 días se les realizó una batería de test motores. Por último, se registraron los datos de supervivencia.

Para evaluar el efecto del tratamiento con T0 sobre la patología neuromuscular de los ratones hSOD1^{G93A}, se realizaron siete mediciones distintas enfocadas en tres aspectos principales:

1. Progresión de la patología: se registraron semanalmente el peso corporal y la puntuación de una escala neurológica.
2. Capacidad locomotora: en los puntos p90 y p120 se realizaron cuatro pruebas motoras: *vertical hanging wire*, test de la fuerza de agarre, test del rotarod y electromiografía.
3. Supervivencia: definida como la incapacidad del animal para erguirse sobre sus cuatro patas cuando se lo coloca de lado durante un periodo de 15 segundos.

Antes de iniciar el estudio principal, se llevó a cabo un experimento piloto con el objetivo de confirmar que la administración del compuesto T0901317 (T0) a través de la dieta permitía su llegada efectiva a la médula espinal y activaba la expresión de genes diana típicos de los receptores LXR, concretamente *ApoE*, *Abca1* y *Srebp1c*. Para ello, se utilizaron ratones *wild-type*, divididos en tres grupos: uno recibió una dieta estándar (grupo control), mientras que los otros dos fueron alimentados con una dieta suplementada con T0 durante uno o dos meses, respectivamente. Finalizado el tratamiento, los animales fueron sacrificados y se extrajo la médula espinal para analizar la expresión génica mediante qPCR. Los resultados mostraron una sobreexpresión significativa de los tres genes analizados en los grupos tratados con T0, con una mayor inducción transcripcional cuanto más prolongada fue la exposición al tratamiento (*Srebp1c*-exp.piloto: WT-Ct = 1,00; WT-2mesesT0 = 5,08; *p-val* = 0,0364; *Abca1*-exp.piloto: WT-Ct = 1,00; SOD1^{G93A} = 8,14; *p-val* = 0,0055; *ApoE*-exp.piloto: WT-Ct = 1,00; SOD1^{G93A} = 2,38; *p-val* = 0,0357) (Figura R25). Estos datos confirmaron que la administración dietética de T0 es una vía eficaz para activar la señalización mediada por LXR en la médula espinal.

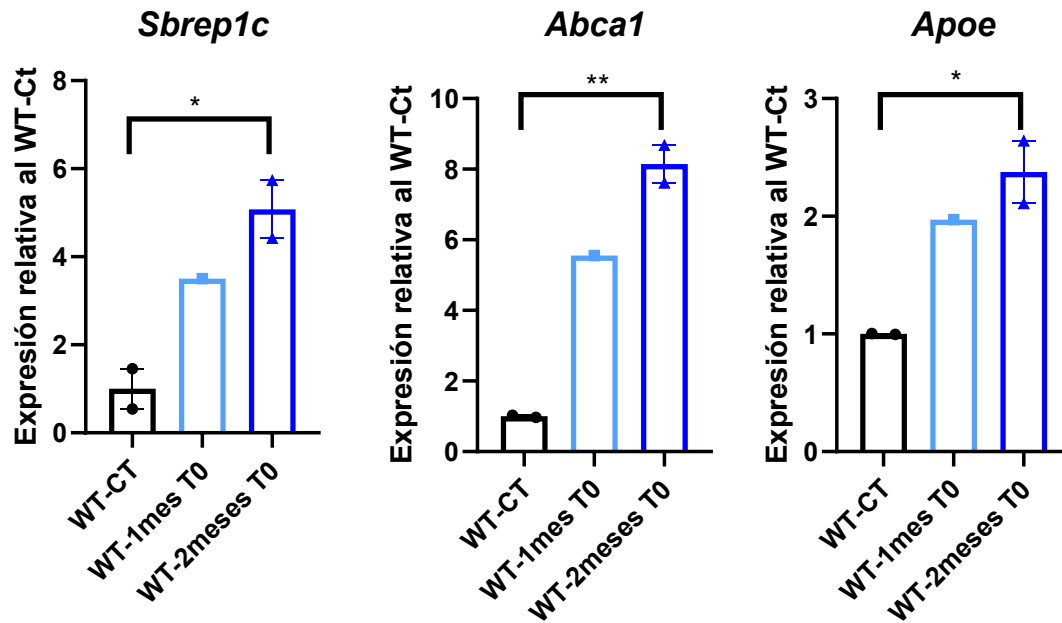


Figura R25. Niveles de expresión de genes diana de la activación de los LXR analizados mediante qPCR de médula espinal lumbar de ratones macho WT. Este experimento piloto se realizó para corroborar que el diseño experimental escogido era capaz de inducir la activación de los genes diana de los LXR en la médula espinal. Para el experimento se utilizaron ratones machos WT de cuatro meses con tres condiciones distintas: habían comido siempre dieta control (WT-CT n= 2) o llevaban un mes comiendo dieta tratada con T0 (WT-1mes T0 n= 1) o llevaban dos meses comiendo dieta tratada con T0 (WT-2meses T0 n=2). Los valores se expresan en relación con el grupo WT-CT. Los datos se representan como la media \pm error estándar de la media (SEM). $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)

2.2 Análisis del efecto del tratamiento con T0 en la progresión de la patología en los ratones hSOD1^{G93A}

El peso corporal es un parámetro de seguimiento general ampliamente utilizado en modelos murinos de neurodegeneración, ya que refleja de forma indirecta la progresión de la patología. En este estudio, se monitorizó el peso de todos los animales dos veces por semana desde el día postnatal 60 (p60), coincidiendo con el inicio del tratamiento dietético con T0901317 (T0), hasta la semana 20.5 (Figura R26). Esta fecha se estableció como punto final del seguimiento porque, a partir de entonces, algunos animales alcanzaban el criterio final del experimento, lo que impedía mantener constante la n experimental.

La primera comparación realizada fue entre los ratones hSOD1^{G93A} sin tratamiento (SOD1-Ct) y los ratones *wild-type* sin tratamiento (WT-Ct), con el objetivo de evaluar el efecto de la enfermedad. En ambos sexos, se observó que mientras los ratones WT-Ct presentaban un aumento progresivo del peso corporal a partir de la octava semana de vida, los ratones SOD1-Ct mantenían un peso estable hasta fases avanzadas de la enfermedad, momento en el que el peso comenzaba a disminuir rápidamente (Figura R26).

A continuación, se compararon los grupos WT-Ct y WT-T0 para identificar posibles efectos no deseados del tratamiento. En ambos sexos, los ratones WT-T0 mostraron un patrón de incremento progresivo del peso corporal similar al de los WT-Ct, aunque con una tendencia no significativa a tener un peso ligeramente mayor. Este aumento solo fue estadísticamente significativo en las hembras WT-T0 durante las semanas 16, 18.5, 19.5 y 20 (indicado con * en la Figura R26).

Finalmente, se realizó la comparación más relevante, ver el efecto del tratamiento en ratones hSOD1^{G93A}. En esta comparación, se observó que los ratones SOD1-T0 presentaban una evolución del peso similar a los SOD1-Ct durante gran parte del desarrollo de la patología. No obstante, los SOD1-T0 mostraron una tendencia no significativa a mantener un peso corporal mayor hasta la semana 17.5 en hembras y la semana 18.5 en machos. A partir de esos puntos, la pérdida de peso fue significativamente mayor en el grupo SOD1-Ct en comparación con los SOD1-T0 (indicado con # en la Figura R26)

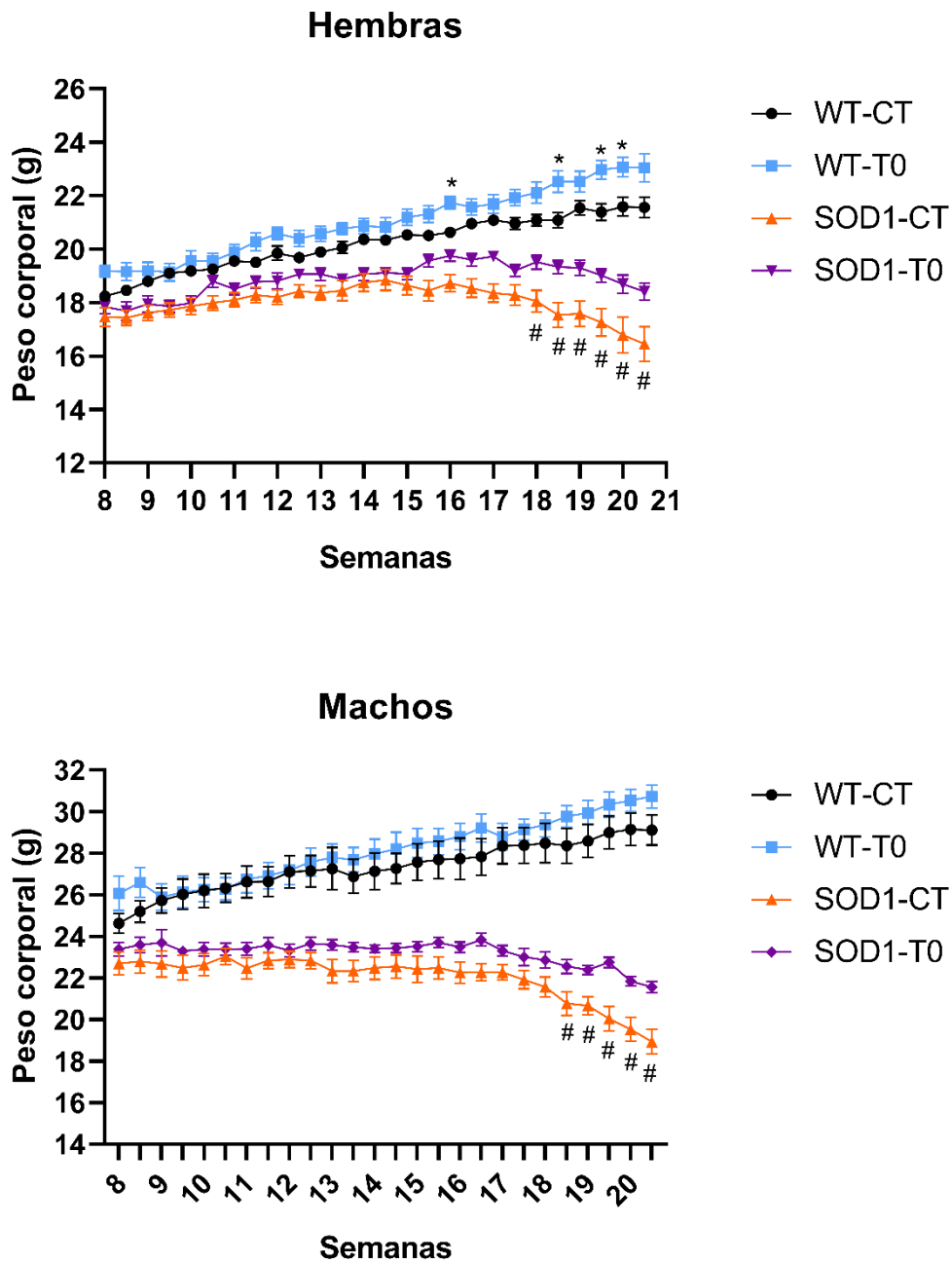


Figura R26. Registro del peso corporal en ratones hSOD1^{G93A} y controles WT con y sin tratamiento con T0. Los ratones se pesaron dos veces por semana para evaluar el progreso de la enfermedad. La N experimental en las hembras fue de 14 para cada uno de los grupos experimentales (WT-CT, WT-T0, SOD1-CT, SOD1-T0) y en machos de 8 para cada uno de los grupos experimentales (WT-CT, WT-T0, SOD1-CT, SOD1-T0). Los datos se representan como la media \pm error estándar de la media (SEM). Se utiliza * cuando $p < 0,05$ en la comparación WT-T0 versus WT-CT y se utiliza # cuando $p < 0,05$ en la comparación SOD1-T0 versus SOD1-CT.

Con el objetivo de monitorizar longitudinalmente la progresión de la patología de forma más directa que mediante el peso corporal, se realizó una evaluación neurológica semanal en los cuatro grupos experimentales: WT-Control, WT-T0, SOD1-Control y SOD1-T0. Esta evaluación se basó en una batería compuesta por tres pruebas complementarias: ambulación, fuerza de agarre y reflejo plantar posterior cada una de ellas puntuada de 0 a 4 según criterios previamente establecidos (para más detalles de la escala clínica consultar sección de Métodos *9.1 Escala Neurológica*). Brevemente, la ambulación evalúa la calidad del patrón de marcha; la fuerza de agarre puntúa la resistencia que oponen las extremidades cuando se tira suavemente del animal por la base de la cola; y el reflejo plantar posterior valora el reflejo de retraer las patas traseras al suspender al ratón por la cola. La suma de las puntuaciones permite obtener una estimación global del estado funcional neuromuscular, siendo la puntuación total más alta indicativa de una mayor afectación motora.

Los animales WT, tanto tratados como no tratados, mantuvieron puntuaciones neurológicas estables y cercanas a cero durante todo el seguimiento, sin presentar signos de deterioro neuromuscular. Por el contrario, los ratones del grupo SOD1-Ct, independientemente del sexo, mostraron un empeoramiento progresivo en la puntuación neurológica a partir de aproximadamente la semana 12, reflejando el inicio de la fase sintomática. Esta progresión continuó hasta el final del seguimiento, en consonancia con el fenotipo característico del modelo hSOD1^{G93A}.

En el grupo hSOD1^{G93A} tratado con T0, el inicio de los síntomas clínicos fue similar al del grupo SOD1-Ct; sin embargo, la progresión de la afectación neurológica fue más lenta. En hembras, la puntuación neurológica fue significativamente menor en el grupo SOD1-T0 desde la semana 17 hasta el final del estudio (Figura R27). En machos, esta diferencia significativa se observó en las semanas 14, 16 y a partir de la semana 19 (Figura R27).

En conjunto, los resultados del peso corporal y la puntuación neurológica indican que la activación de los receptores LXR mediante el compuesto T0 modula favorablemente la progresión de la patología neuromuscular en ratones hSOD1^{G93A}, retrasando la aparición de los síntomas clínicos y atenuando el deterioro motor progresivo.

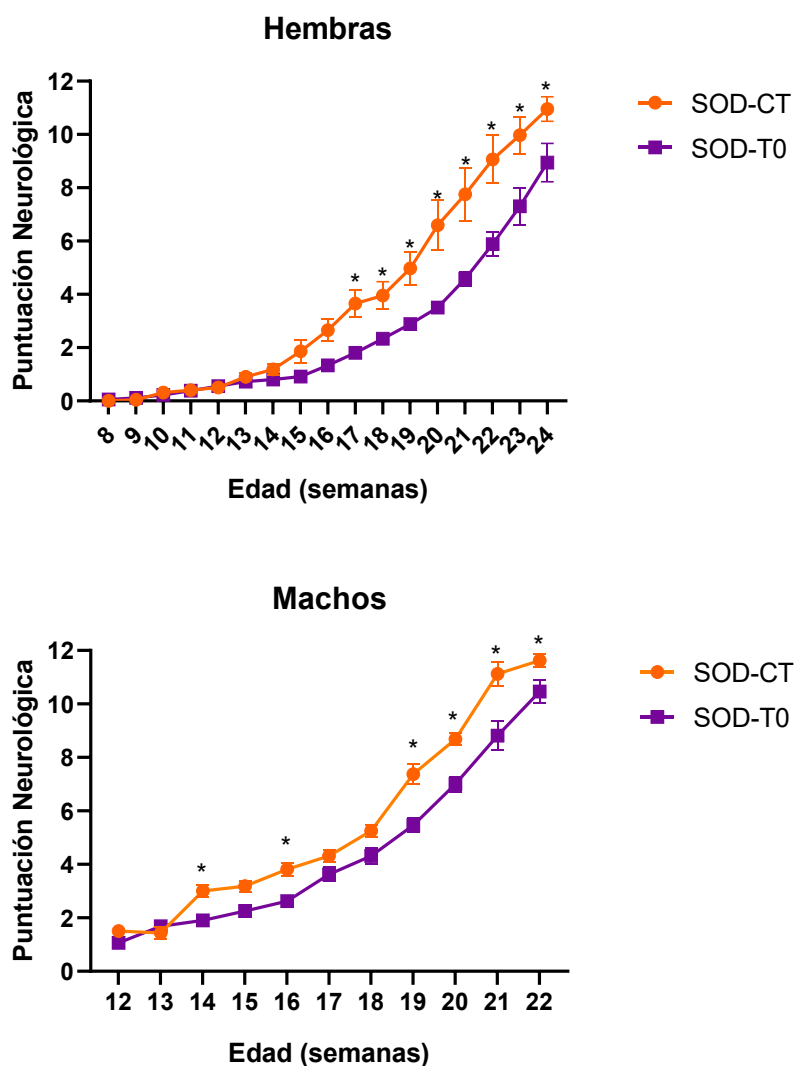


Figura R27. Puntuación de la escala neurológica realizada en ratones $hSOD1^{G93A}$ con y sin tratamiento con T0. Esta evaluación se realizó semanalmente y estaba compuesta de tres pruebas: ambulación, fuerza de agarre y reflejo plantar posterior donde cada una de ellas puntuada de 0 a 4. La N experimental en las hembras fue de 14 para cada uno de los grupos experimentales (SOD1-CT, SOD1-T0) y en machos de 8 para cada uno de los grupos experimentales (SOD1-CT, SOD1-T0). Los datos se representan como la media \pm error estándar de la media (SEM). Las comparaciones estadísticas entre ambos grupos se realizaron mediante t -tests no apareados en cada punto temporal. Se aplicó corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples. se consideró significativo: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)).

2.3 Evaluación de la capacidad locomotora en estadios iniciales y sintomáticos en ratones hSOD1^{G93A} con el tratamiento T0

Para el impacto del tratamiento con T0 en la capacidad locomotora de los ratones se realizaron cuatro test motores: *hanging wire vertical*, test de la fuerza de agarre, test del rotarod y electromiograma. Estas pruebas se realizaron en dos puntos temporales: estadio inicial (p90) y estadio de sintomatología avanzada (p120).

2.3.1 Vertical hanging wire

La prueba del *hanging wire* es una herramienta clásica para evaluar la fuerza de agarre, la resistencia muscular y la coordinación motora en modelos murinos. Consiste en colocar al animal suspendido por las patas anteriores sobre un alambre metálico invertido, registrando el tiempo que es capaz de mantenerse sin caer. Sin embargo, en nuestro modelo, los ratones en estado sintomático avanzado (p120) no presentan fuerza suficiente para mantenerse sujetos en estas condiciones. Esto impide detectar diferencias funcionales sutiles entre grupos en fases avanzadas. Por ello se decidió la modificación a un alambre vertical que reduce la exigencia física del ensayo, facilitando una evaluación más sensible.

A p90 se observa un aumento en el tiempo en que se mantienen en la rejilla metálica en los ratones SOD1-T0, aunque solo en el caso de los machos este aumento es estadísticamente significativo (SOD1-Ct: 39,04 s; SOD1-T0: 50.79 s; p-val: 0,02). A p120 tanto las hembras (SOD1-Ct: 28,36 s; SOD1-T0: 41.04 s; p-val: 0,004) como los machos (SOD1-Ct: 23,04 s; SOD1-T0: 36,51 s; p-val: 0,008) del grupo SOD1-T0 mostraban un aguante mayor sin caerse de la rejilla (Figura R28).

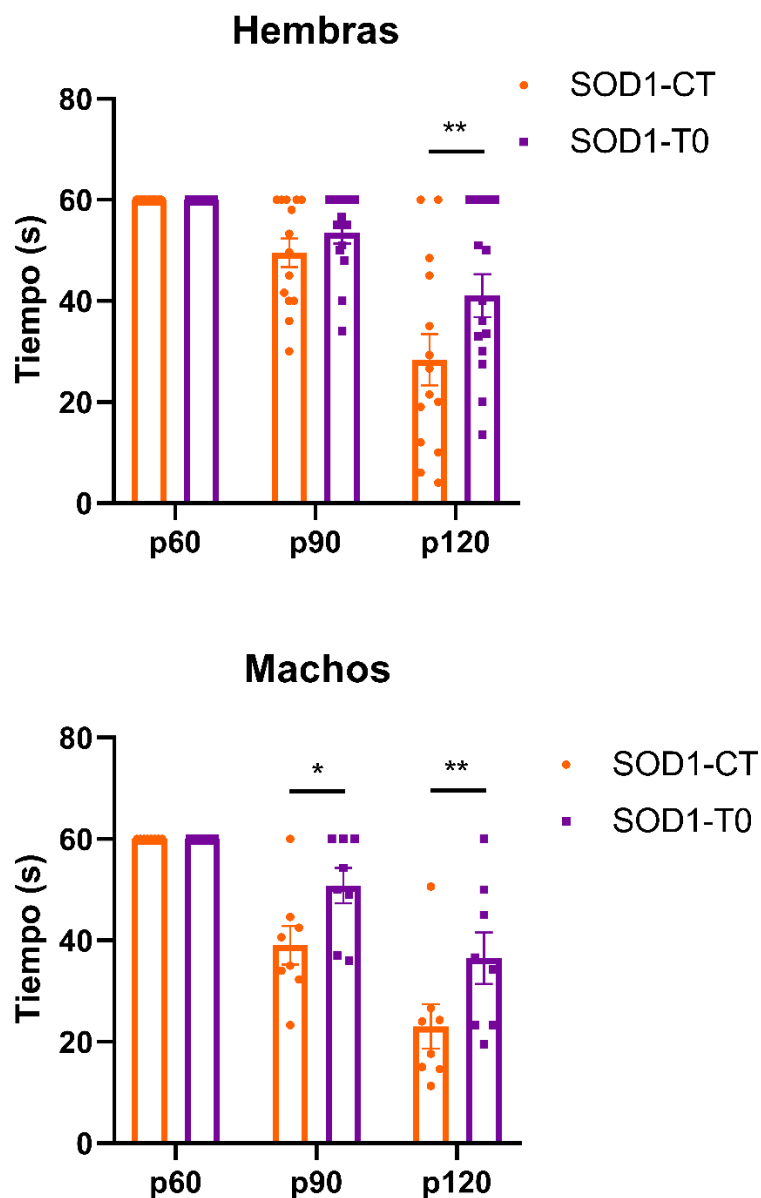


Figura R28. Evaluación de la fuerza y resistencia muscular mediante el test del *hanging wire* vertical en ratones hSOD1^{G93A} con y sin tratamiento T0. Se representa el tiempo de suspensión de los ratones en el test en dos puntos temporales: p90 y p120. La N experimental en hembras fue 14 para cada uno de los grupos experimentales (SOD1-CT, SOD1-T0) y en el caso de los machos de 8 para cada uno de los grupos experimentales (SOD1-CT, SOD1-T0). Los datos se muestran como media \pm error estándar de la media (SEM). Las comparaciones entre grupos en cada tiempo se realizaron mediante *t*-tests no apareados. Se aplicó corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples. Se consideró significativo $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)).

2.3.2 Test de fuerza de agarre

La prueba del “*grip strength*” se empleó para cuantificar de manera directa la fuerza de agarre de los animales, como indicador funcional del estado neuromuscular. Para ello, los ratones fueron evaluados en los puntos temporales p90 y p120 mediante un dinamómetro acoplado a una rejilla metálica. El valor registrado corresponde a la fuerza máxima ejercida por el animal al ser suavemente retirado hacia atrás.

Lo primero que se analizó fue si el tratamiento con T0 tenía algún efecto sobre la fuerza de agarre en ratones WT. En las hembras, no se observaron diferencias significativas entre los grupos (P90: WT-Ct = 196,9; WT-T0 = 206,3; $p = 0,74$; P120: WT-Ct = 211,4; WT-T0 = 216,4; $p = 0,94$). En los machos, aunque el grupo WT-T0 mostró una tendencia a valores más altos de fuerza, las diferencias no fueron estadísticamente significativas (P90: WT-Ct = 220,7; WT-T0 = 252,5; $p = 0,0623$; P120: WT-Ct = 225,6; WT-T0 = 245,6; $p = 0,3804$) (Figura R29).

A continuación, se compararon los grupos SOD1-Ct y WT-Ct para evaluar el impacto de la enfermedad. Ya desde P90, se observó una disminución significativa de la fuerza de agarre en ambos sexos (Hembras – P90: WT-Ct = 196,9; SOD1-Ct = 124,1; $p < 0,0001$; Machos – P90: WT-Ct = 220,7; SOD1-Ct = 84,2; $p < 0,0001$) (Figura R29).

Por último, se evaluó el efecto del tratamiento comparando los grupos SOD1-T0 y SOD1-Ct. Desde las fases iniciales de la enfermedad, el tratamiento con T0 mejoró significativamente la fuerza de agarre en ambos sexos (Hembras – P90: SOD1-T0 = 152,6; SOD1-Ct = 124,1; $p = 0,0144$; Machos – P90: SOD1-T0 = 118,0; SOD1-Ct = 84,2; $p = 0,0416$). Esta mejora se mantuvo en estadios avanzados (Hembras – P120: SOD1-T0 = 120,2; SOD1-Ct = 87,5; $p = 0,0033$; Machos – P120: SOD1-T0 = 94,7; SOD1-Ct = 55,6; $p = 0,0164$) (Figura R29).

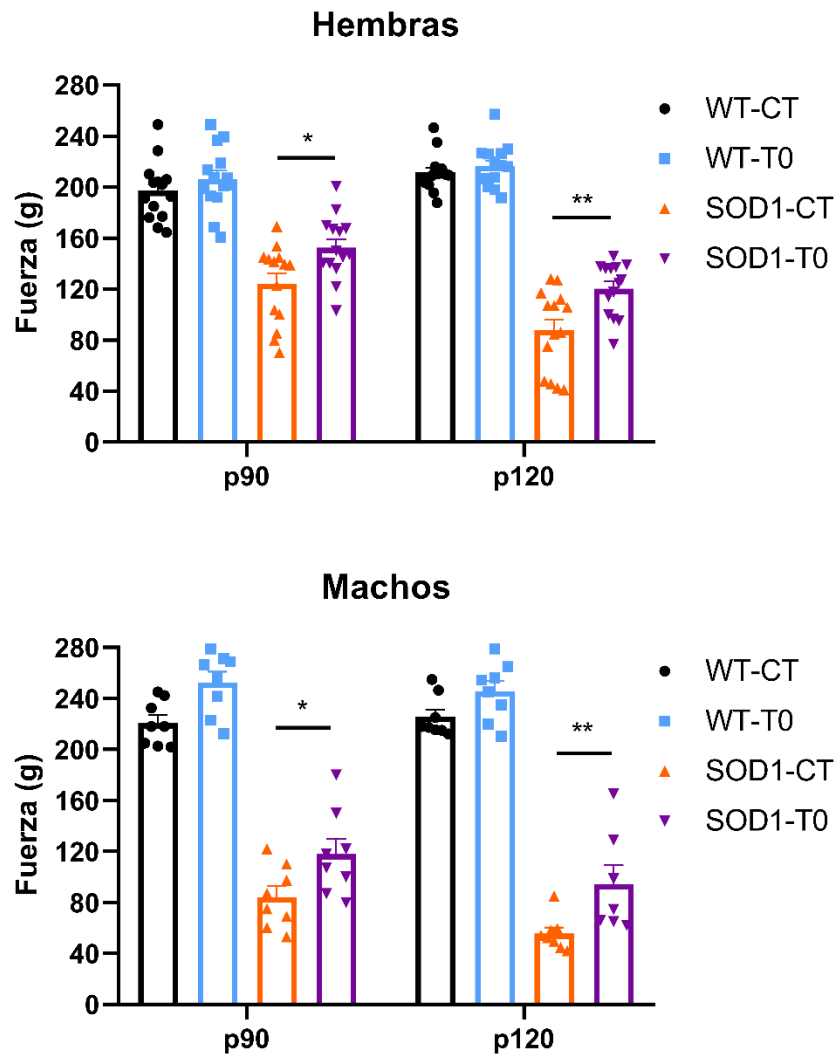


Figura R29. Evaluación de la fuerza de agarre en ratones hSOD1^{G93A} y WT, con y sin tratamiento T0. El test en dos puntos temporales: p90 y p120. La N experimental en hembras fue 14 para cada uno de los grupos experimentales (WT-CT, WT-T0, SOD1-CT, SOD1-T0) y en el caso de los machos de 8 para cada uno de los grupos experimentales (WT-CT, WT-T0, SOD1-CT, SOD1-T0). Los datos se muestran como media \pm error estándar de la media (SEM). Las comparaciones estadísticas entre grupos se realizaron mediante ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Tukey. Se consideró significativo $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)).

2.3.3 Test del Roratod

El test de rotarod se utilizó para evaluar la coordinación motora y el equilibrio de los animales. En este ensayo, los ratones fueron colocados sobre una plataforma giratoria cuya velocidad aumentaba progresivamente, registrándose el tiempo que lograban mantenerse sobre el rodillo sin caer. La prueba se realizó en los puntos temporales p90 y p120.

Se evaluó en primer lugar el efecto del tratamiento con T0 sobre el rendimiento motor de los animales WT en la prueba de rotarod. Los resultados mostraron que, tanto en machos como en hembras, los animales tratados presentaron tiempos sobre el rodillo comparables a los controles, sin diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los dos puntos temporales (Hembras – P90: WT-Ct = 230,6; WT-T0 = 209,7; $p = 0,2663$; Machos – P90: WT-Ct = 204,6; WT-T0 = 187,4; $p = 0,4575$; Hembras – P120: WT-Ct = 219,5; WT-T0 = 214,7; $p = 0,9734$; Machos – P120: WT-Ct = 211,7; WT-T0 = 202,8; $p = 0,8695$) (Figura R30).

Posteriormente, se compararon los ratones hSOD1^{G93A} sin tratamiento con sus controles WT. En ambas edades y sexos, los animales hSOD1^{G93A} mostraron un tiempo significativamente reducido en la plataforma giratoria, lo que indica un compromiso temprano y progresivo de la coordinación motora asociado a la enfermedad (Hembras – P90: WT-Ct = 230,6; SOD1-Ct = 140,8; $p < 0,0001$; Machos – P90: WT-Ct = 204,6; SOD1-Ct = 112,1; $p < 0,0001$; Hembras – P120: WT-Ct = 219,5; SOD1-Ct = 79,9; $p < 0,0001$; Machos – P120: WT-Ct = 211,7; SOD1-Ct = 55,6; $p < 0,0001$) (Figura R30).

Finalmente, se analizó el impacto del tratamiento en los ratones hSOD1^{G93A}. En P90, aunque los animales tratados tendieron a mantenerse durante más tiempo sobre el rodillo en comparación con los no tratados, esta diferencia no alcanzó significación estadística (Hembras – P90: SOD1-Ct = 140,8; SOD1-T0 = 161,0; $p = 0,2904$; Machos – P90: SOD1-Ct = 112,1; SOD1-T0 = 132,3; $p = 0,2482$). Sin embargo, en p120, cuando la afectación motora es más pronunciada, el tratamiento con T0 logró mejorar significativamente el rendimiento en la prueba, tanto en machos como en hembras (Hembras – P120: SOD1-Ct = 79,9; SOD1-T0 = 115,6; $p = 0,0121$; Machos – P120: SOD1-Ct = 55,6; SOD1-T0 = 86,4; $p = 0,0303$) (Figura R30).

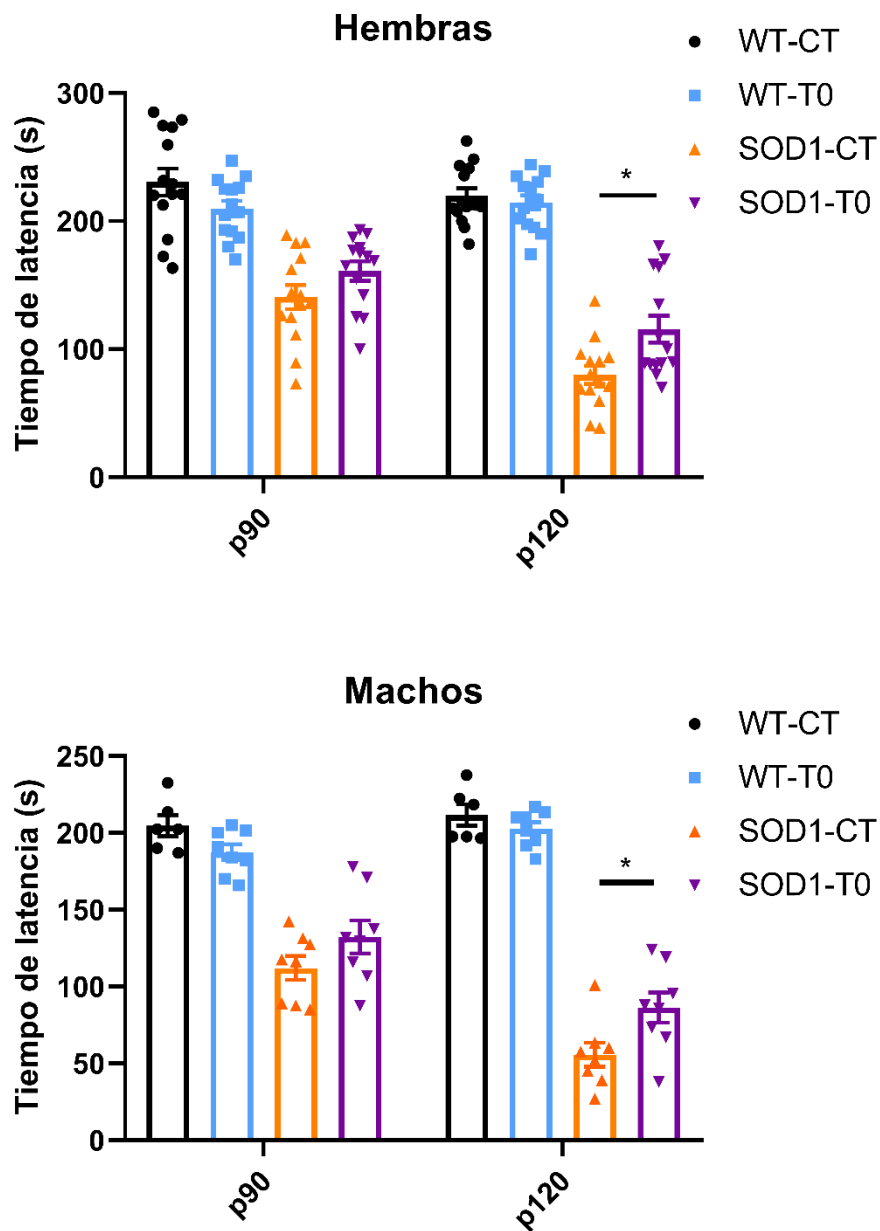


Figura R30. Evaluación de la coordinación motora mediante la prueba del *rotarod* en ratones *hSOD1^{G93A}* y WT, con y sin tratamiento T0. Se muestra el tiempo de permanencia en la barra rotatoria (en segundos) de los ratones antes de caer, como medida de la coordinación motora y el equilibrio. El test se realizó en dos puntos temporales: p90 y p120. La N experimental en hembras fue 14 para cada uno de los grupos experimentales (WT-CT, WT-T0, SOD1-CT, SOD1-T0) y en el caso de los machos de 8 para cada uno de los grupos experimentales (WT-CT, WT-T0, SOD1-CT, SOD1-T0). Los datos representan la media \pm error estándar de la media (SEM). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Tukey para comparaciones múltiples. Se consideró significativo $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)

2.3.4 Electromiograma

Para evaluar la integridad funcional de la unidad motora, se registró el potencial de acción compuesto muscular (cMAP) del músculo *tibialis anterior*. Esta técnica permite estimar de forma objetiva el grado de denervación y deterioro neuromuscular.

En los animales WT, los valores de cMAP se mantuvieron estables y sin diferencias significativas entre los grupos con o sin tratamiento, tanto en p90 como en p120, lo que indica que el tratamiento con T0 no afecta negativamente la transmisión neuromuscular en condiciones fisiológicas (Hembras – P90: WT-Ct = 78,47 mV; WT-T0 = 75,03 mV; $p = 0,5761$; Machos – P90: WT-Ct = 79,87 mV; WT-T0 = 71,93 mV; $p = 0,3744$; Hembras – P120: WT-Ct = 72,13 mV; WT-T0 = 74,18 mV; $p = 0,8704$; Machos – P120: WT-Ct = 80,83 mV; WT-T0 = 78,87 mV; $p = 0,9776$) (Figura R 31).

Al comparar los ratones SOD1-Ct con sus controles WT, se observó una reducción muy intensa de hasta el 75% de la amplitud del cMAP ya en p90, que se acentuó en p120, en consonancia con la progresiva pérdida de función neuromuscular característica de este modelo (Hembras – P90: WT-Ct = 78,47 mV; SOD1-Ct = 20,38 mV; $p < 0,0001$; Machos – P90: WT-Ct = 79,87 mV; SOD1-Ct = 16,23 mV; $p < 0,0001$; Hembras – P120: WT-Ct = 72,13 mV; SOD1-Ct = 12,65 mV; $p < 0,0001$; Machos – P120: WT-Ct = 80,83 mV; SOD1-Ct = 10,63 mV; $p < 0,0001$) (Figura R31).

En los ratones hSOD1^{G93A} tratados con T0, la amplitud del cMAP fue, en promedio, entre 8 y 10 mV superior a la de los no tratados desde etapas tempranas, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa en los machos a p90. No obstante, en p120, los animales tratados mostraron una disminución significativamente menor en la respuesta muscular, tanto en machos como en hembras (Hembras – P90: SOD1-T0 = 27,94 mV; SOD1-Ct = 20,38 mV; $p = 0,0252$; Machos – P90: SOD1-T0 = 26,57 mV; SOD1-Ct = 16,23 mV; $p = 0,0525$; Hembras – P120: SOD1-T0 = 21,12 mV; SOD1-Ct = 12,65 mV; $p = 0,0110$; Machos – P120: SOD1-T0 = 21,23 mV; SOD1-Ct = 10,63 mV; $p = 0,0449$) (Figura R31).

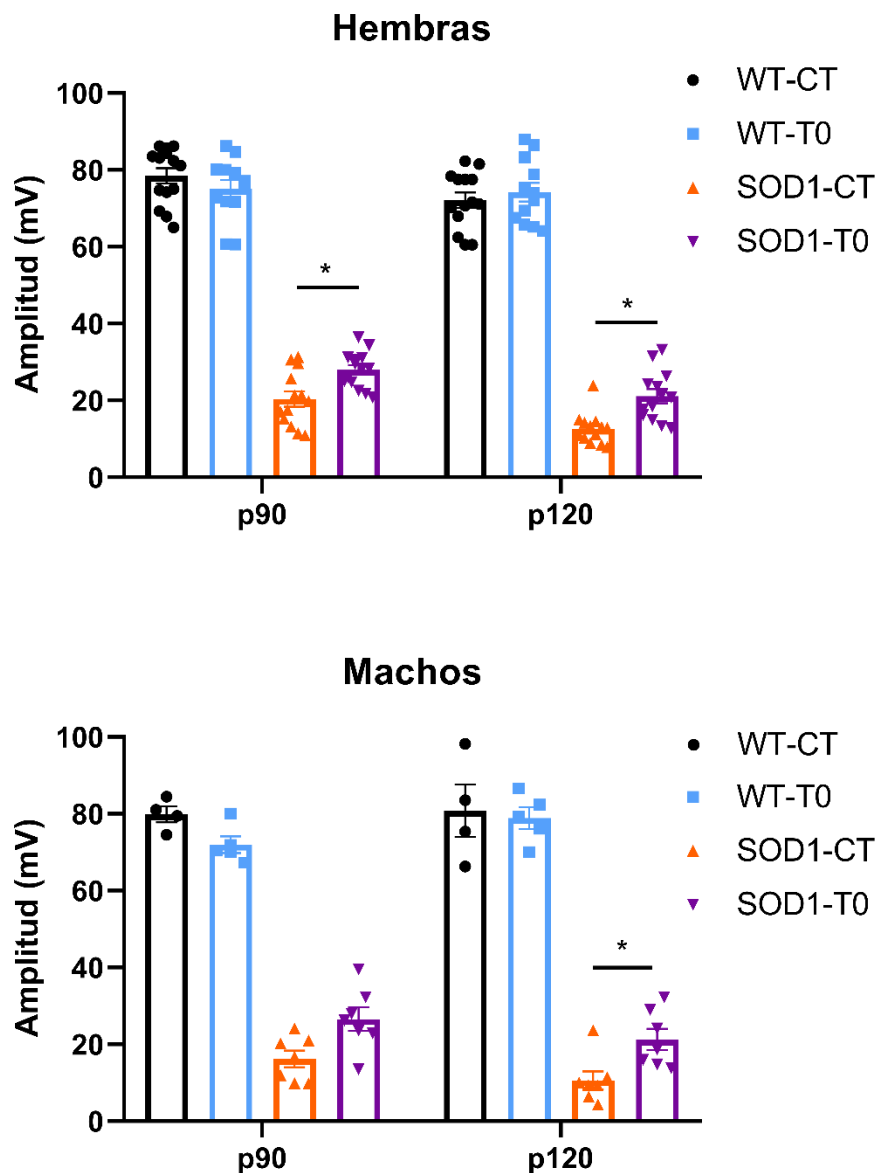


Figura R31. Evaluación de la función neuromuscular mediante electromiografía (EMG) en ratones hSOD1^{G93A} y WT, con y sin tratamiento T0 Se muestra la amplitud del potencial de acción muscular compuesto (cMAP), registrado mediante EMG tras estimulación del nervio ciático y registro en el músculo gastrocnemio. El test se realizó en dos puntos temporales: p90 y p120. La N experimental en hembras fue 14 para cada uno de los grupos experimentales (WT-CT, WT-T0, SOD1-CT, SOD1-T0) y en el caso de los machos de 8 para cada uno de los grupos experimentales (WT-CT, WT-T0, SOD1-CT, SOD1-T0). Los datos representan la media \pm error estándar de la media (SEM). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Tukey para comparaciones múltiples. Se consideró significativo $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)

2.4 Estudio del efecto del tratamiento con T0 en la supervivencia de los ratones los ratones hSOD1^{G93A}

Para valorar el impacto del tratamiento con T0 sobre la progresión global de la enfermedad, se realizó un análisis de supervivencia en ratones hSOD1^{G93A}. Se consideró como criterio de *end-point* el momento en que el animal, al ser colocado de lado, era incapaz de incorporarse sobre sus cuatro patas en un plazo de 15 segundos, lo que indica un grado avanzado de deterioro y justifica el fin del experimento.

La probabilidad de supervivencia de los grupos SOD1-Ct y SOD1-T0 se representó mediante curvas de Kaplan–Meier, que evidenciaron visualmente una diferencia en la supervivencia entre ambos grupos (Figura R32). Para determinar si esta diferencia era estadísticamente significativa a lo largo del tiempo, se aplicó el test de log-rank (Mantel–Cox). Este análisis reveló un incremento significativo en la supervivencia del grupo SOD1-T0 en ambos sexos, con una media de 11 días más en las hembras y 7 días más en los machos (Hembras: SOD1-T0 = 185,5 días; SOD1-Ct = 174,5 días; $p = 0,0026$. Machos: SOD1-T0 = 166 días; SOD1-Ct = 159 días; $p = 0,0149$).

Estos resultados refuerzan la observación de que el tratamiento con el agonista de los LXR, T0, ejerce un efecto beneficioso en la progresión de la enfermedad, enlenteciéndola de manera significativa.

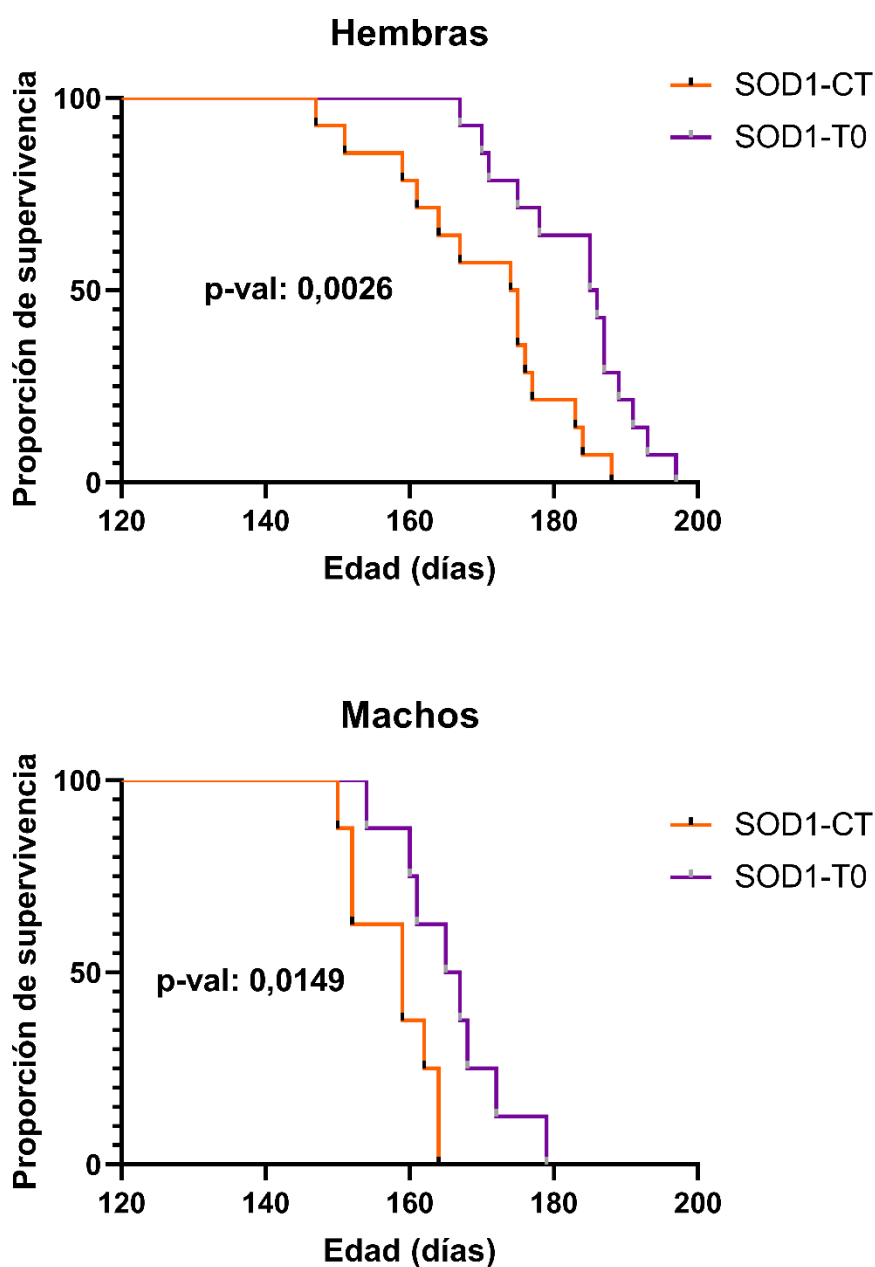


Figura R32. Análisis de la supervivencia en ratones hSOD1^{G93A} con y sin tratamiento T0. Se representan las curvas de Kaplan-Meier correspondientes a la supervivencia de los ratones hSOD1^{G93A} tratados o no tratados, expresada como proporción de supervivencia a lo largo del tiempo (en días). La N experimental en hembras fue 14 para cada uno de los grupos experimentales (WT-CT, WT-T0, SOD1-CT, SOD1-T0) y en el caso de los machos de 8 para cada uno de los grupos experimentales (WT-CT, WT-T0, SOD1-CT, SOD1-T0). El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de log-rank (*Mantel-Cox*) para comparar las curvas de supervivencia entre grupos. $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. (Hembras: SOD1-T0 = 185,5 días; SOD1-Ct = 174,5 días; $p = 0,0026$. Machos: SOD1-T0 = 166 días; SOD1-Ct = 159 días; $p = 0,0149$).

2.5 Resumen de los efectos del tratamiento con T0 en los ratones los ratones hSOD1^{G93A}

El resumen de los efectos que tiene el tratamiento con T0 en los ratones hSOD1^{G93A} está descrito en la Tabla R3. Brevemente, tanto en hembras como en machos el tratamiento enlentecía la progresión de la patología reflejado en forma de una pérdida de peso menos acentuada y un menor aumento de la puntuación en la escala neurológica. Esto era acompañado de un mejor rendimiento motor en diferentes pruebas (*Vertical hanging wire*, test de la fuerza de agarre, rotarod y electromiograma). Por último, la supervivencia se veía significativa mejorada.

Mediciones		Resultados			
Efectividad del compuesto T0		Llega a la médula espinal y activa los genes dianas de los LXR			
Peso corporal		En el estadio avanzado reduce el declive de peso			
Escala neurológica		Retrasa la progresión de la patología			
Supervivencia		Significativamente aumentada			
Rendimiento motor	p90 ♀	p120 ♀	p90 ♂	p120 ♂	
Hanging wire	=	✓	✓	✓	
F. de agarre	✓	✓	✓	✓	
Rotarod	=	✓	=	✓	
EMG	✓	✓	=	✓	

Tabla R3. Resumen de los efectos del tratamiento T0 en el modelo murino hSOD1^{G93A}. La tabla recoge los principales efectos observados tras la administración de T0 en ratones hSOD1^{G93A} incluyendo datos de progresión de la enfermedad (peso corporal y escala neurológica), rendimiento motor (hanging wire vertical, rotarod, EMG) y supervivencia. Se indican los cambios relativos respecto al grupo no tratado, así como el momento temporal en que se evaluó cada parámetro. El signo = indica que no hay diferencias significativas mientras que el tick verde indica una mejora estadísticamente significativa.

Estos resultados, en su conjunto, posicionan a las alteraciones del metabolismo del colesterol como una prometedora diana terapéutica en la ELA. Sin embargo, si dichas alteraciones se restringen únicamente a mutaciones en *SOD1*, su aplicabilidad traslacional sería limitada, ya que solo alrededor del 2 % de los pacientes con ELA presentan mutaciones en este gen. Para evaluar si estas alteraciones en el metabolismo del colesterol constituyen un fenómeno más general y no exclusivo del contexto *SOD1*, se planteó una serie de experimentos en el tercer y último bloque de este trabajo.

Bloque 3. Evaluando las alteraciones del metabolismo del colesterol como un mecanismo fisiopatológico general de la ELA y no específico de mutaciones *SOD1*

3.1 Comparación del transcriptoma del metabolismo del colesterol en modelos murinos con mutaciones en *SOD1*, *TARDBP* y *FUS*

Tras haber caracterizado las alteraciones en el metabolismo del colesterol en la médula espinal del modelo murino hSOD1^{G93A} y haber demostrado que estas disfunciones constituyen una diana terapéutica prometedora, como reflejan los efectos beneficiosos del tratamiento con el compuesto T0901317 (T0), nos planteamos si dichas alteraciones transcriptómicas son específicas de la mutación en *SOD1* o si, por el contrario, podrían representar un mecanismo fisiopatológico común a otros modelos murinos con mutaciones en otros genes comunes de la ELA.

Con este objetivo, se llevó a cabo un análisis comparativo de datos transcriptómicos de médula espinal procedentes de tres modelos murinos de ELA, portadores de mutaciones en *SOD1*, *FUS* y *TARDBP* (este último referenciado como TDP-43 cuando se hace referencia a la proteína en vez de al gen). Cabe destacar que los modelos murinos de *TARDBP* y *FUS* elegidos eran modelos que poseíamos en nuestro animalario y que tienen la particularidad de que a diferencia del modelo hSOD1^{G93A} no son modelos transgénicos. El modelo TDP-43^{M323K} expresa de manera fisiológica el gen murino *Tardbp* con una mutación puntual que provoca un cambio de aminoácido en la posición 323. El modelo FUSdelta14 expresa de manera fisiológica el gen murino *Fus* con una mutación puntual que provoca que no se codifique a proteína el exón 14. Las características de los estudios de RNA-seq seleccionados están descritas en la tabla R4:

Modelo	Tejido	Edad	Sexo	Referencia
hSOD1 ^{G93A}	Médula Espinal	3 meses	Hembras	Fernández-Beltrán et al., 2021 ¹⁵⁴
FUSDelta14	Médula Espinal	2 meses	Machos	Ali et al., 2023 ¹⁵⁶
TDP-43 ^{M323K/M323K}	Médula Espinal	9 meses	Machos	García-Toledo et al., 2025 ¹⁵⁵

Tabla R4. Resumen de las principales características de los estudios de RNA-seq de médula espinal elegidos para comparar el efecto de distintas mutaciones en genes relacionados con ELA sobre el transcriptoma del metabolismo del colesterol.

En el modelo hSOD1^{G93A}, como ya se había analizado en la sección de Resultados 1.1 *Análisis del transcriptoma de la médula espinal de ratones hSOD1^{G93A}*, 1173 genes se encontraban diferencialmente expresados (DEGs), de los cuales 127 estaban relacionados con funciones lipídicas. El modelo TDP-43^{M323K} presentó un número similar de DEGs totales (1182), con 93 genes lipídicos. En contraste, el modelo FUSdelta14 mostró una menor desregulación transcriptómica, con 285 DEGs totales, entre los cuales solo 16 correspondían a genes asociados al metabolismo lipídico (Figura R33 A).

Al comparar los genes lipídicos diferencialmente expresados entre los tres modelos (Figura 33 B), se observó que únicamente dos genes, *Ggt5* y *C3*, estaban desregulados de forma común en los tres contextos, lo cual puede atribuirse al bajo número de DEGs lipídicos detectados en el modelo FUSdelta14. El gen *Ggt5* tiene como función principal participar en el catabolismo del glutatión, pero también está involucrado en el metabolismo de leucotrienos. Esto sugiere que la inflamación mediada por leucotrienos podría ser un proceso común en la médula espinal de los distintos modelos murinos de ELA. El gen *C3* codifica para una proteína relevante en el sistema del complemento (inmunidad innata) y tiene asociado el GO term “lipid metabolic process” porque se ha descrito que en adipocitos esta proteína promueve la síntesis de ácidos grasos. Sin embargo, lo más probable es que en el contexto de médula espinal su función se limite a la activación del sistema del complemento, algo que podría estar ocurriendo de forma común en los tres modelos murinos. Por último, al comparar exclusivamente los modelos hSOD1^{G93A} y TDP-43^{M323K}, se identificaron 13 genes lipídicos adicionales en común (*Lpl*, *Hexa*, *Esy1*, *Rbp1*, *Pla2g15*, *Ano4*, *Slc22a4*, *Plcb1*, *Fam135b*, *Stard4*, *Asah2*, *Gpd1*, *Cpne1*, además de *Ggt5* y *C3*) (Figura 33 B) lo que sugiere una mayor similitud en los procesos de desregulación lipídica entre estos dos modelos. Sin embargo, solo el gen *Stard4* tiene funciones en el metabolismo del colesterol lo que podría sugerir que las alteraciones del metabolismo del

colesterol encontradas en la médula del modelo hSOD1^{G93A} no se replican en las del TDP43^{M323K}.

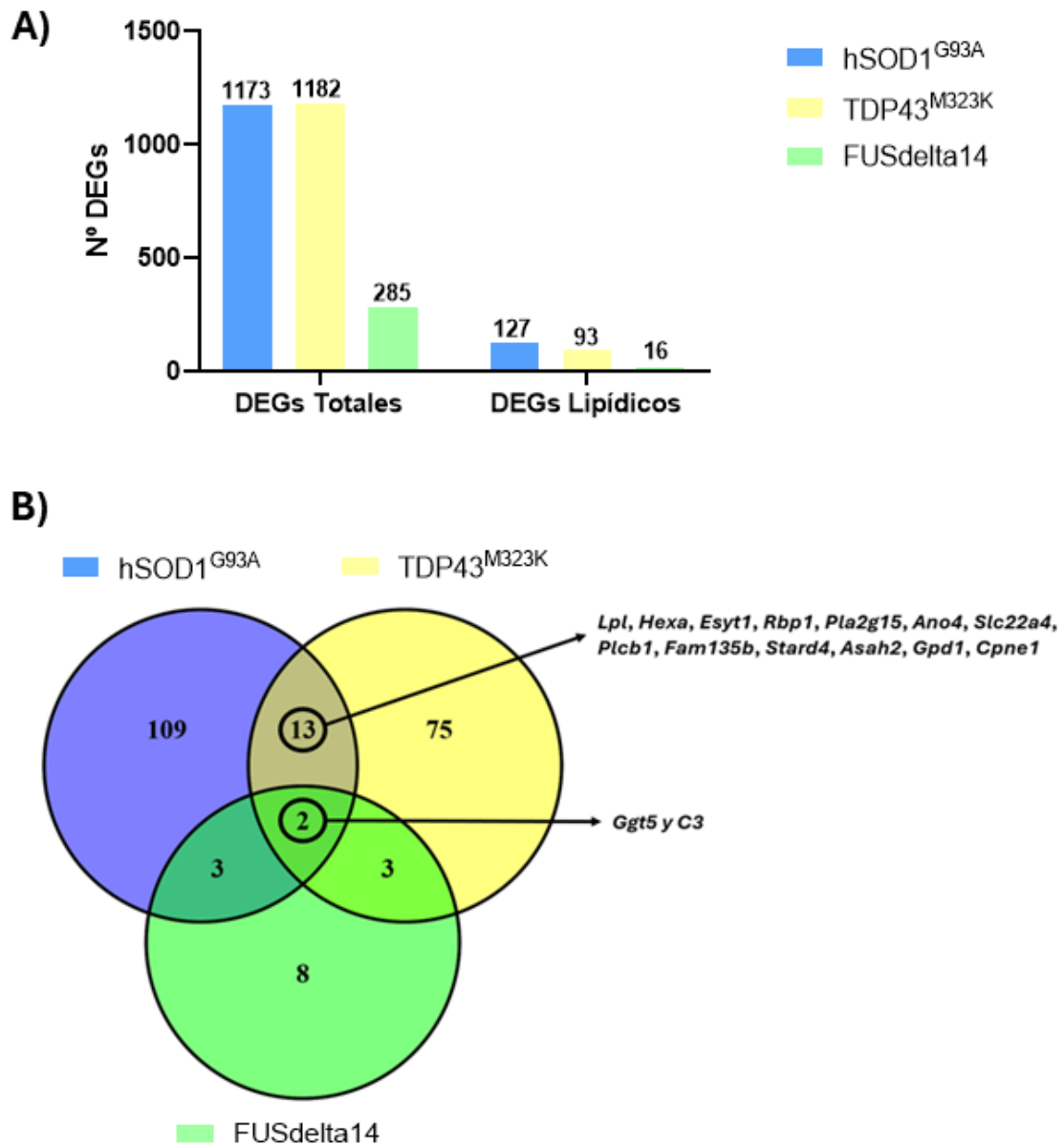


Figura R33. Comparativa de los transcriptomas lipídicos de la médula espinal de los modelos murinos hSOD1^{G93A}, TDP-43^{M323K} y FUSdelta14. A) Comparación del número DEGs totales y lipídicos identificados en los análisis de RNA-seq de los tres modelos murinos. B) Diagrama de Venn para visualizar cuantos DEGs lipídicos son comunes entre los tres modelos murinos.

Para profundizar en este análisis, se compararon los valores de *fold change* de genes clave implicados en el metabolismo del colesterol utilizando los datos transcriptómicos de los tres modelos de ELA analizados. En primer lugar, se evaluó la vía de síntesis de colesterol, centrándose en los genes que codifican las 25 enzimas directamente involucradas en este proceso (Figura R34 A). En el modelo hSOD1^{G93A}, como ya se ha descrito previamente en este trabajo, todos estos genes presentan valores de log₂Foldchange negativos, lo que indica una inhibición generalizada de la síntesis de colesterol. De manera similar, en el modelo TDP-43, la mayoría de estos genes también muestran una regulación negativa, con magnitudes comparables a las observadas en hSOD1^{G93A}, lo que sugiere que este proceso también está afectado. En contraste, en el modelo FUSdelta14 no se identifica una tendencia clara hacia la sobreexpresión o represión de estos genes, lo que indica que la síntesis de colesterol podría no estar alterada de forma relevante en este modelo.

A continuación, se evaluó la vía del transporte de colesterol, haciéndose una selección de los 44 genes más relevantes en este proceso (Figura 34 B). En el modelo hSOD1^{G93A}, tal como se había descrito previamente en este trabajo, predominan los genes con valores de *log2foldchange* positivos, lo que refleja una activación del sistema de transporte de colesterol en la médula espinal. De forma aún más llamativa, en el modelo TDP-43^{M323K} se observó que los 44 genes analizados presentaban valores de *fold change* positivos, lo que sugiere una desregulación aún más pronunciada del transporte de colesterol en comparación con el modelo hSOD1^{G93A}. Por el contrario, en el modelo FUSdelta14 no se evidenció una tendencia clara: los valores de expresión fueron más heterogéneos, sin una dirección común hacia la activación o la inhibición de los genes estudiados, lo que sugiere que el transporte de colesterol no estaría afectado de forma consistente en este modelo.

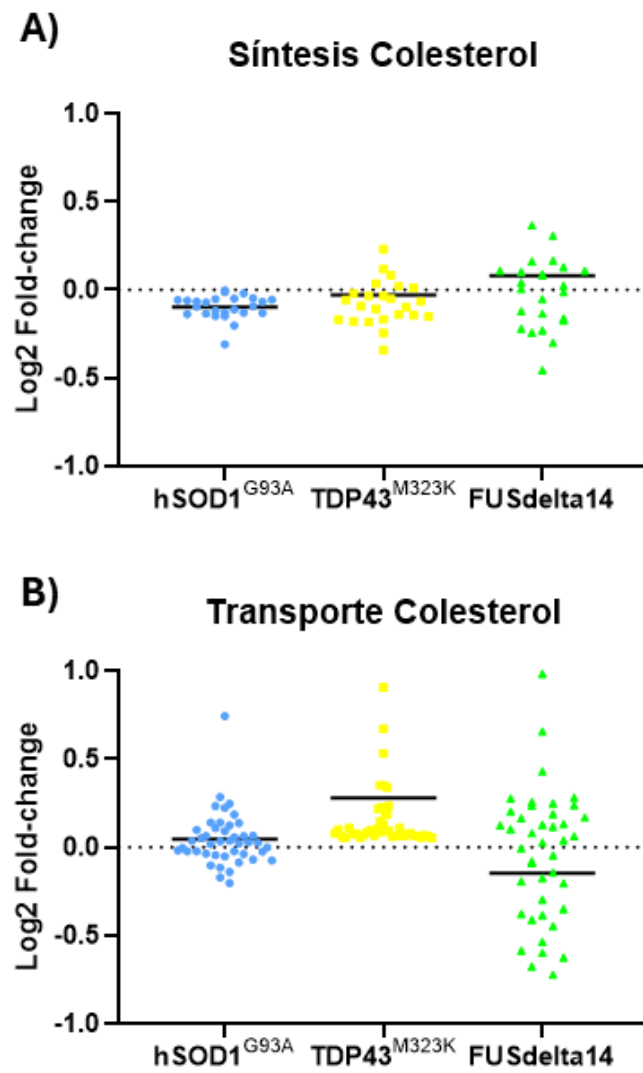


Figura R34. Comparativa de los valores de *fold-change* que tienen los genes relacionados con A) Biosíntesis de colesterol, B) Transporte de colesterol en los estudios de RNA-seq analizados de los modelos murinos hSOD1^{G93A} (azul), TDP-43^{M323K} (amarillo) y Fusedelta14 (verde).

3.2 Estudio de *Mendelian Randomization* sobre el efecto que tienen factores de riesgo lipídico en el riesgo de sufrir ELA

Tradicionalmente, las alteraciones en el metabolismo de los lípidos observadas en pacientes y modelos animales se han considerado una mera consecuencia secundaria de los procesos neurodegenerativos. Sin embargo, en este trabajo describimos cómo diversas vías metabólicas se encuentran desreguladas desde estadios tempranos de la enfermedad, y cómo algunas de ellas, en particular las relacionadas con el colesterol, podrían tener un potencial terapéutico.

Con el objetivo de evaluar hasta qué punto estas alteraciones lipídicas podrían desempeñar un papel causal en la ELA, decidimos realizar un estudio de *Mendelian Randomization* (MR). Este enfoque utiliza la variación genética como un experimento natural para investigar relaciones causales entre factores de riesgo potencialmente modificables y desenlaces en salud, a partir de datos observacionales. De esta forma, las variantes genéticas actúan como herramientas que permiten establecer vínculos causales entre un posible factor de riesgo y una enfermedad, minimizando los sesgos y factores de confusión que afectan a los métodos epidemiológicos tradicionales.

En este estudio, planteamos la hipótesis de que ciertas variantes genéticas asociadas con rasgos metabólicos lipídicos podrían contribuir al desarrollo de formas clínicas específicas de ELA. Para poner a prueba esta hipótesis, llevamos a cabo un estudio de MR utilizando los datos más actualizados de estudios de asociación del genoma completo (GWAS) relacionados con el metabolismo lipídico, agrupados en nueve factores de riesgo: triglicéridos totales (TG), colesterol total (TC), colesterol LDL (LDL), colesterol HDL (HDL), ácido linoleico, docosahexaenoico (DHA), ácidos grasos omega-3, ácidos grasos omega-6 y ácidos grasos totales. Estos factores fueron contrastados con datos de un GWAS de ELA de 2018 con una N total de 80.610 individuos (20.806 pacientes y 59.804 controles) y 10.031.630 variantes analizadas¹⁵⁷(Figura 35).

La asociación causal entre las exposiciones (los rasgos lipídicos) y el desenlace (ELA) fue evaluada principalmente mediante el método ponderado por la inversa de la varianza (inverse variance weighted, IVW). Además, se aplicaron métodos de sensibilidad que permiten tener en cuenta la pleiotropía, como la regresión MR-Egger, la mediana simple y la mediana ponderada, para reforzar la solidez de los hallazgos.

De los nueve rasgos lipídicos circulantes analizados, encontramos que cuatro de ellos mostraron una asociación causal significativa con la ELA según el análisis principal IVW: colesterol total ($p = 0.011$, OR = 1.11, IC 95% = 1.02–1.20), colesterol LDL ($p = 0.035$, OR = 1.11, IC 95% = 1.01–1.21), ácido linoleico ($p = 0.022$, OR = 1.12,

IC 95% = 1.016–1.24) y ácidos grasos omega-6 ($p = 0.033$, OR = 1.12, IC 95% = 1.00–1.25) (Figura R36). Entre estos cuatro rasgos, solo el colesterol LDL mostró una asociación significativa consistente también en los análisis de sensibilidad con la mediana ponderada ($p = 0.038$, OR = 1.15, IC 95% = 1.00–1.32) y el colesterol total se acercó mucho a la significancia estadística con el método de la mediana simple ($p = 0.065$, OR = 1.13, IC 95% = 0.99–1.28) (Figura R36). Estos datos sugieren que tener mayores niveles de colesterol total y colesterol LDL aumentan el riesgo de sufrir ELA.

Por último, se buscó profundizar en qué genes relacionados con el metabolismo del colesterol podrían desempeñar un papel causal en la patología. Para ello, se analizaron los 1.079 SNPs asociados a los nueve rasgos lipídicos considerados. De ellos, 89 también mostraron una asociación significativa con el riesgo de desarrollar ELA. Sin embargo, solo 56 de estos SNPs tenían un gen asociado. De forma llamativa, la mayoría de los genes identificados, a pesar de estar relacionados con factores de riesgo lipídicos, no tienen funciones lipídicas anotadas. Solo cuatro genes estaban directamente vinculados con el metabolismo del colesterol: *Apob*, *Ttc39b*, *Vldlr* y *Pcsk9*. Todos ellos participan en procesos de transporte de colesterol, lo que sugiere, una vez más, que alteraciones en el transporte del colesterol podrían tener un papel relevante en la fisiopatología de la ELA.

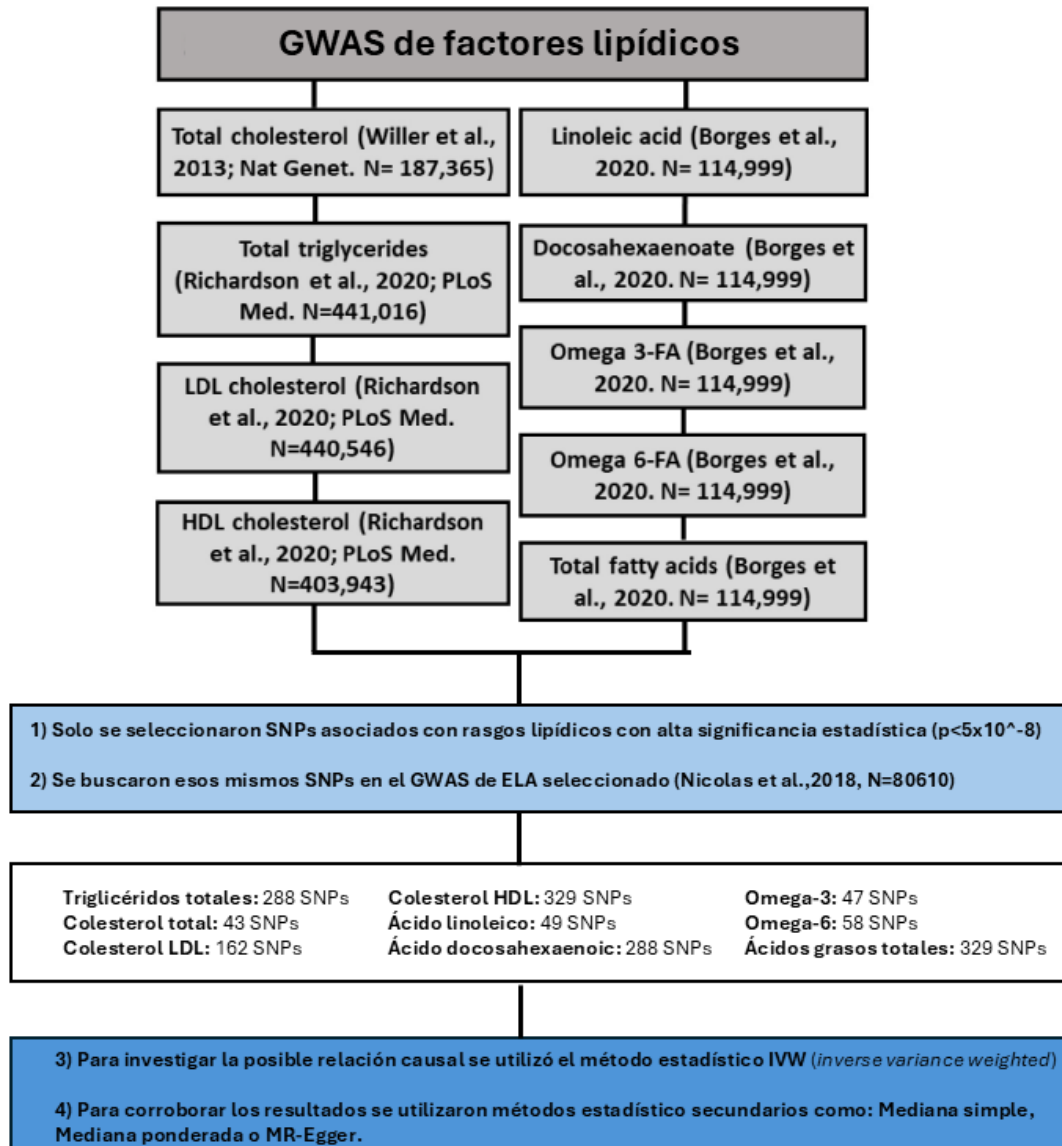


Figura R35. Diagrama de flujo del proceso de identificación y selección de estudios de asociación a nivel genómico (GWAS) y de los SNPs utilizados como variables instrumentales en el análisis de aleatorización mendeliana para la ELA (B). Se incluyeron 9 rasgos lipídicos: triglicéridos totales, colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL, ácido linoleico, docosahexaenoico, ácidos grasos omega-3, ácidos grasos omega-6 y ácidos grasos totales.

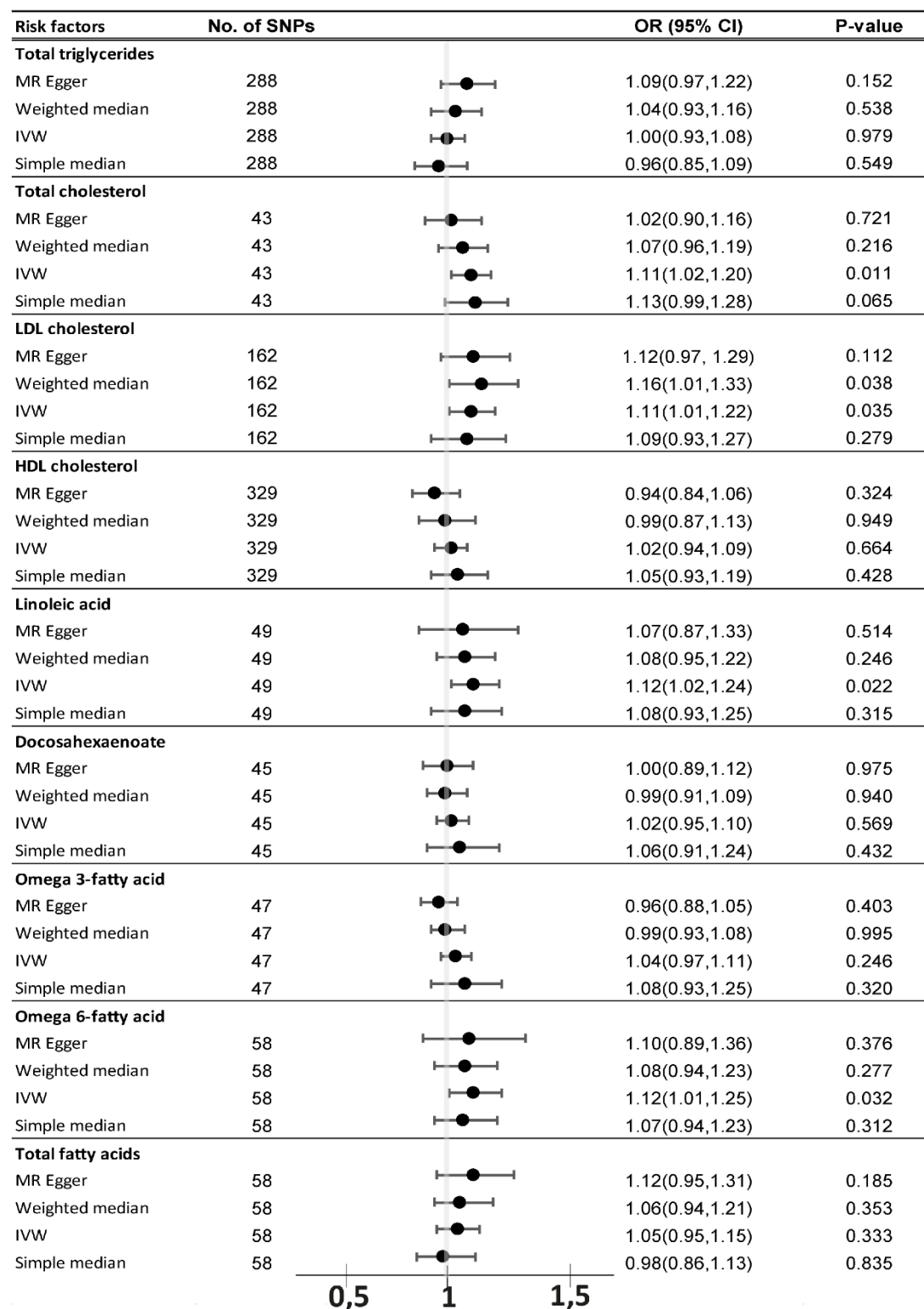


Figura R36. Razón de probabilidades (Odd ratio) y diagrama de bosque de la asociación causal con el riesgo de ELA según los niveles de lípidos circulantes. IC: intervalo de confianza; IVW: método ponderado por la inversa de la varianza; SNPs: polimorfismos de un solo nucleótido.

Discusión

Discusión

1 ¿Qué aporta el uso de los meta-análisis de estudios de RNA-seq a este trabajo?

Las técnicas de secuenciación de ARN (RNA-seq) han demostrado ser herramientas poderosas para caracterizar el transcriptoma de tejidos o tipos celulares específicos en momentos y contextos particulares. No obstante, a pesar de la creciente accesibilidad de estas tecnologías, su coste sigue siendo una limitación importante para muchos estudios, afectando directamente el número de réplicas biológicas y la profundidad de secuenciación alcanzada. Esto compromete la capacidad para detectar de forma robusta cambios sutiles en la expresión génica entre condiciones experimentales. Además, las normativas de bienestar animal imponen restricciones éticas que obligan a utilizar el menor número de animales posible, lo cual también limita el tamaño muestral. Otro factor a tener en cuenta es la variabilidad técnica que puede surgir entre laboratorios. Incluso cuando se aplican protocolos similares, las diferencias en el procesamiento de muestras, el material biológico inicial, las plataformas utilizadas o los enfoques de análisis bioinformático pueden llevar a resultados divergentes entre estudios que, en teoría, analizan lo mismo.

En este contexto, el uso de meta-análisis de datos de RNA-seq provenientes de estudios independientes pero comparables se convierte en una estrategia valiosa. Esta aproximación permite incrementar el número efectivo de réplicas biológicas, disminuir la variabilidad metodológica y, en consecuencia, aumentar el poder estadístico para detectar genes diferencialmente expresados¹⁴⁹. Esta estrategia resulta especialmente útil en etapas muy iniciales de enfermedades neurodegenerativas, donde ciertos cambios transcriptómicos pueden ser sutiles y estar ocultos por fuertes cambios transcripcionales en procesos fisiopatológicos muy genéricos como la activación del sistema inmune.

Uno de los objetivos prioritarios de este trabajo fue identificar alteraciones transcripcionales tempranas y tardías en rutas metabólicas lipídicas en la médula espinal de ratones *hSOD1^{G93A}*. Para ello, realizamos nuestro propio experimento de RNA-seq a partir de médula espinal de hembras *hSOD1^{G93A}* al inicio de la patología (p90). Como era esperable para esta fase inicial de la enfermedad, la mayoría de los genes diferencialmente expresados presentaban cambios de magnitud moderada, con un rango de valores de *log2foldchange* de ± 1.5 . Además, el top 10 procesos biológicos más desregulados estaban relacionados con procesos proinflamatorios y con alteraciones en la neurotransmisión opacando otras

posibles alteraciones biológicas relevantes. Dado que nos interesaban específicamente los cambios en rutas lipídicas, decidimos reforzar el poder de detección integrando nuestro estudio con otros trabajos transcriptómicos disponibles en bases de datos públicas, correspondientes también a estadios tempranos de la enfermedad, mediante un meta-análisis conjunto (MA-inicial). Paralelamente, recopilamos datos transcriptómicos de otros tres estudios realizados en fases sintomáticas tardías, y llevamos a cabo un segundo meta-análisis independiente (Ma-avanzado). Este enfoque nos permitió comparar ambos momentos de la enfermedad y explorar qué genes y rutas lipídicas están alteradas exclusivamente en estadios tempranos o, por el contrario, persisten hasta etapas avanzadas, confirmando también hallazgos previamente reportados en la literatura.

2 ¿Qué importancia tiene las rutas lipídicas identificadas en el meta-análisis en la patología de la ELA?

Tras realizar los meta-análisis se pudieron identificar tres rutas del metabolismo de lípidos que están alteradas desde el inicio de la patología y cuyas desregulaciones se potencian con el avance de la enfermedad: el metabolismo de esfingolípidos, el de eicosanoides y el del colesterol.

2.1 Implicaciones de las alteraciones del metabolismo de esfingolípidos en la ELA

El sistema nervioso central (SNC) presenta una elevada concentración de esfingolípidos, cuyos metabolitos no solo desempeñan un papel estructural en las membranas celulares, sino que también actúan como segundos mensajeros en numerosos procesos de señalización intracelular. Entre las funciones en las que participan se incluyen la proliferación y diferenciación celular, las interacciones entre células, la migración, y los mecanismos de señalización tanto intra como extracelular, así como la regulación de la muerte celular⁸⁹.

El meta-análisis reveló una represión significativa en la expresión de varios genes clave para la síntesis de estos lípidos, entre ellos *Ugcg*, *Ugt8a*, *B4galnt1* y *St8sia1*. De especial relevancia resulta la alteración de *Ugcg*, ya que codifica la enzima responsable del paso inicial en la ruta de síntesis de glucoesfingolípidos: la glicosilación de la ceramida para formar glucosilceramida. A este desequilibrio se suma la sobreexpresión de *Gba*, el gen que codifica la enzima lisosomal encargada de degradar la glucosilceramida, lo que podría contribuir a una mayor reducción de sus niveles y, en consecuencia, a un aumento en la acumulación de ceramidas. Este patrón es coherente con estudios previos que han reportado un acúmulo de ceramidas en médula espinal, tanto en pacientes con ELA como en el modelo murino hSOD1^{G93A}¹²⁵. Cabe destacar que las ceramidas tienen efectos proapoptóticos en neuronas corticales y en motoneuronas^{178,179}, y que se ha observado un incremento de estos lípidos en motoneuronas espinales derivadas de pacientes con ELA, pero no en neuronas oculomotoras¹⁸⁰, lo que sugiere que su acumulación podría estar implicada en la vulnerabilidad selectiva y contribuir a la patogénesis de la enfermedad.

Además, a partir de la glucosilceramida se generan múltiples esfingolípidos complejos, entre los cuales destacan los gangliósidos. Estas moléculas se encuentran en alta proporción en el sistema nervioso central, donde participan en procesos clave como el reconocimiento celular, la transducción de señales, la transmisión sináptica, la cognición y la diferenciación de oligodendrocitos¹⁸¹. Curiosamente, en nuestro meta-análisis, se detectó una sobreexpresión temprana de las subunidades de la enzima β -hexosaminidasa (HEXA y HEXB), cuya función es degradar el gangliósido GM2 a GM3. Este último gangliósido ha sido relacionado con la plasticidad, el crecimiento y la reparación neuronal¹⁸². Estos datos sugieren que podría estar produciéndose un aumento compensatorio en los niveles de GM3 como mecanismo protector frente al inicio de los procesos neurodegenerativos. Este posible efecto beneficioso del GM3 ha sido respaldado por un estudio que demostró que la administración intracerebroventricular directa de GM3 retrasaba significativamente el inicio de la parálisis y prolongaba la supervivencia de los

ratones hSOD1^{G93A} ¹²⁹. Otro dato que apunta a esta dirección es el hecho de que mutaciones en los genes *HEXA* y *HEXB* provocan una acumulación excesiva de gangliósidos originando enfermedades conocidas como gangliosidosis, entre ellas Tay-Sachs y Sandhoff, cuyas manifestaciones clínicas pueden simular los síntomas de la ELA¹⁸³.

2.2 Implicaciones de las alteraciones del metabolismo de eicosanoides en la ELA

Los eicosanoides son lípidos bioactivos derivados de ácidos grasos poliinsaturados de 20 carbonos, principalmente del ácido araquidónico. Actúan como moléculas de señalización local y están implicados en múltiples procesos fisiológicos y patológicos, entre ellos la inflamación, la respuesta inmune, la vasodilatación y la coagulación. Los principales grupos de eicosanoides incluyen tromboxanos, leucotrienos, prostaglandinas y lipoxinas.

En el meta-análisis de estadios iniciales de la enfermedad se detectó una sobreexpresión del gen *Pla2g15*, involucrado en la liberación de ácido araquidónico desde los fosfolípidos de membrana, junto con una activación de genes responsables de la síntesis de derivados proinflamatorios del ácido araquidónico, como *Ptgs1*, *Tbxas1*, *Hpgd* y *Ggt5*, entre otros. Esta desregulación se intensifica en fases avanzadas de la enfermedad, donde se observa un aumento en el número y la magnitud de genes alterados en estas rutas.

Estudios lipídicos han demostrado un incremento en los niveles de metabolitos intermedios de la síntesis de lipoxinas y leucotrienos como el 12-HETE y 15-HETE, así como de las prostaglandinas PGE2 y PGD2, y del tromboxano B2, en ratones hSOD1^{G93A} ¹⁸⁴. Siguiendo esta misma tendencia, se han documentado niveles elevados de la prostaglandina PGE2 y de las enzimas implicadas en su síntesis y metabolismo, tanto en suero como en líquido cefalorraquídeo de pacientes con ELA¹⁸⁵.

Evidencias adicionales sobre la implicación de la vía del ácido araquidónico en la disfunción y muerte de motoneuronas en ELA han sido aportadas en un estudio multiómico de Lee et al. 2021¹⁸⁰. Empleando motoneuronas espinales derivadas de células madre pluripotentes inducidas (iPSC) de pacientes con mutaciones asociadas a ELA, los autores compararon su perfil molecular con el de neuronas oculomotoras (poco afectadas en la ELA). El análisis conjunto de datos transcriptómicos y metabolómicos reveló una activación sostenida de la ruta del ácido araquidónico como una característica distintiva de las motoneuronas

espinales afectadas. En particular, el análisis metabolómico identificó una reducción significativa de un análogo inhibidor de la 5-lipoxigenasa (5-LOX) en cultivos de motoneuronas espinales derivadas de pacientes. De hecho, estos mismos autores usaron inhibidores conocidos de 5-LOX como agentes terapéuticos en motoneuronas derivadas de iPSC, en un modelo de *Drosophila* con mutación en el gen *C9ORF72* y en ratones *hSOD1^{G93A}*, mostrando un efecto beneficioso sobre la supervivencia celular¹⁸⁰.

2.3 Implicaciones de las alteraciones del metabolismo de colesterol en la ELA

Al analizar el perfil de expresión génica relacionado con el metabolismo del colesterol en los meta-análisis, se identificaron dos grupos funcionalmente opuestos. Por un lado, un conjunto de genes involucrados en la síntesis de colesterol cuya expresión se encuentra progresivamente reprimida a medida que avanza la enfermedad. Por otro, un grupo de genes cuya expresión aumenta con el tiempo y que están implicados principalmente en el transporte intracelular y extracelular del colesterol.

Las alteraciones en el metabolismo del colesterol han sido previamente asociadas con la ELA. La mayoría de los estudios se han centrado en el nivel sistémico, evaluando muestras de suero, donde se ha observado un incremento en los niveles de colesterol total y colesterol LDL en pacientes con ELA^{135,137,186} (aunque también existen resultados contradictorios^{187,188}). De hecho, en una cohorte de casi 640.000 individuos seguidos durante un periodo de 20 años, se observó que niveles elevados de LDL y una mayor relación LDL/HDL se asociaban con una mayor susceptibilidad a desarrollar ELA¹⁸⁹. De forma complementaria otro estudio mostró que el riesgo de sufrir ELA era 1.075 mayor cuando se atribuye a niveles de LDL, independientemente del subtipo de enfermedad¹⁹⁰. Paradójicamente, algunos trabajos han señalado que niveles elevados de colesterol sérico pueden tener un valor pronóstico positivo, al asociarse con una mayor supervivencia en pacientes con ELA^{138,187,191}. En estos estudios el aumento de supervivencia llegaba a ser mayor a 12 meses aunque al corregir por factores de confusión estos resultados dejaban de ser significativos.

Sin embargo, dado que el colesterol no atraviesa la barrera hematoencefálica, su síntesis y almacenamiento en el sistema nervioso central (SNC) se produce de forma autónoma y sin contribución periférica¹⁹². Por ello, los niveles séricos de colesterol podrían no reflejar con fidelidad los cambios que ocurren en el SNC, y

viceversa. Aunque esto podría no ser del todo exacto ya que se han descrito alteraciones en la barrera hematoencefálica (BBB) tanto en pacientes con ELA como en modelos murinos portadores de la mutación *SOD1*^{193,194}. El aumento de la permeabilidad de estas barreras a lo largo de la progresión de la enfermedad podría dificultar aún más la interpretación de las concentraciones de colesterol circulante. Aún así, el análisis del líquido cefalorraquídeo (LCR) se considera una fuente más representativa de las alteraciones biológicas que ocurren en la médula espinal degenerada. En un estudio lipidómico realizado en LCR de pacientes con ELA frente a controles, se observó un aumento del colesterol, pero también una disminución de algunos de sus precursores, lo que sugiere un metabolismo alterado¹³¹.

No obstante, uno de los hallazgos más relevante fue la acumulación de ésteres de colesterol en muestras de médula espinal, tanto de pacientes como de ratones h*SOD1*^{G93A}^{125,126}. Dodge y colaboradores describieron que esta acumulación afecta a ésteres de colesterol saturados, monoinsaturados y poliinsaturados, siendo más marcada en la sustancia gris, región donde se observa la degeneración de las motoneuronas, en contraste con la sustancia blanca ventral. Este hecho refuerza la hipótesis de que la inhibición de la síntesis de colesterol y la activación de mecanismos de transporte, observados en el meta-análisis, podrían representar una respuesta compensatoria frente al exceso de colesterol intracelular. En este sentido, se ha descrito que ratones que sobreexpresan *SREBF2* desarrollan degeneración de motoneuronas, parálisis y una supervivencia reducida, acompañadas de una acumulación de ésteres de colesterol¹²⁶. De forma interesante, los niveles de lisofosfatidilcolina (Lyso-PC), un subproducto de la síntesis de ésteres de colesterol, también se encuentran aumentados en la médula espinal tanto de pacientes como de ratones h*SOD1*^{G93A}. Se ha demostrado que Lyso-PC induce desmielinización rápida y resulta tóxico para cultivos de motoneuronas, lo que sugiere que la acumulación de ésteres de colesterol podría tener un efecto neurotóxico mediado por este subproducto metabólico¹²⁶.

Además del almacenamiento en forma esterificada, una vía alternativa para reducir el colesterol en el SNC consiste en su oxidación a oxisteroles, que, al ser menos hidrofóbicos, pueden atravesar la barrera hematoencefálica, a diferencia del colesterol libre. Para explorar esta vía, analizamos la expresión de genes clave en la síntesis de oxisteroles: *Ch25h*, *Cyp27a1* y *Cyp46a1*. De esta manera observamos una sobreexpresión muy significativa de *Ch25h* desde las fases iniciales de la enfermedad, lo que nos llevó a analizar su expresión también en la fase presintomática (p60), donde también se detectó una activación de este gen.

En pacientes con ELA, se ha reportado un incremento de 25-hidroxicolesterol (25-OHC), metabolito producido por la enzima CH25H, el cual se ha asociado con una mayor severidad clínica y una progresión más rápida de la enfermedad¹³². Aunque en nuestro estudio no se detectó una alteración significativa en la expresión de

Cyp46a1 (enzima que produce 24-OHC), diversos trabajos han demostrado que este oxisterol se encuentra elevado en médula espinal de pacientes con ELA y que puede inducir muerte celular en líneas celulares de neuroblastoma¹²⁷. De hecho, el 24S-OHC constituye la principal vía de excreción del colesterol, ya que más del 90% del 24S-OHC producido diariamente es liberado desde el sistema nervioso central hacia la periferia¹⁹⁵. La enzima responsable de convertir el colesterol en 24S-hidroxicolesterol es específica del cerebro y se expresa predominantemente en las neuronas, lo que sugiere que estas podrían ser especialmente vulnerables a un exceso de colesterol¹⁹⁶. En conjunto, estos hallazgos respaldan la hipótesis de que la acumulación de oxisteroles como 24-OHC y 25-OHC podría ejercer un efecto neurotóxico en el SNC. Por el contrario, se han descrito niveles disminuidos de 27-OHC en suero de pacientes con ELA^{63,197}, lo que concuerda con nuestros hallazgos de reducción en la expresión de *Cyp27a1* en la médula espinal de ratones hSOD1^{G93A} en fase avanzada (p120). Cabe destacar que un estudio de asociación del genoma completo (GWAS) identificó a CYP27A1 como un gen asociado a la ELA¹⁹⁸, lo que sugiere que las alteraciones en los niveles de oxisteroles podrían desempeñar un papel en la enfermedad. Sin embargo, en pacientes no se ha encontrado una correlación significativa entre los niveles de 27-OHC y la supervivencia¹⁹⁷.

Un reciente estudio de este mismo año 2025 ha determinado que las alteraciones en el metabolismo del colesterol también ocurren en el músculo esquelético de los pacientes de ELA. En este tejido se observó una acumulación de colesterol, correlacionada con la gravedad clínica, junto con una sobreexpresión de los genes transportadores lisosomales NPC1 y NPC2. De forma relevante, el aumento de NPC2 ya estaba presente en portadores asintomáticos de mutaciones asociadas a ELA, lo que indica una alteración temprana¹⁴³.

Las numerosas alteraciones en el metabolismo del colesterol observadas en pacientes con ELA han llevado a cuestionar si el uso de estatinas, fármacos que reducen su síntesis, podría influir de manera positiva o negativa en la enfermedad. Sin embargo, los estudios disponibles no apoyan un efecto perjudicial: un estudio prospectivo mostró que el tratamiento con estatinas no afecta la supervivencia global de los pacientes con ELA, por lo que no se recomienda suspender su uso¹⁹⁹. De forma consistente, un estudio retrospectivo en 459 pacientes, de los cuales 72 recibían estatinas al inicio de la enfermedad, no encontró asociación significativa entre este tratamiento y un mayor riesgo de ELA²⁰⁰. Además, un metaanálisis reciente que incluyó 13.890 pacientes de ocho estudios clínicos confirmó la ausencia de relación entre el uso prolongado de estatinas y el riesgo de desarrollar la enfermedad²⁰¹.

3 ¿Por qué la activación de la vía de los LXR es una interesante diana terapéutica en las enfermedades neurodegenerativas y más en específico en la ELA?

Como ya se ha comentado anteriormente, la inhibición de genes implicados en la síntesis de colesterol, junto con la sobreexpresión de genes relacionados con su transporte, podría interpretarse como una respuesta compensatoria frente a un posible exceso de colesterol intracelular. Esta hipótesis se ve reforzada por la presencia de acúmulos de ésteres de colesterol en la médula espinal, observados tanto en pacientes como en modelos murinos de la enfermedad^{125,126}.

La principal vía encargada de regular los niveles intracelulares de colesterol está mediada por los “*Liver X Receptors*” (LXR), unos receptores nucleares que se activan en presencia de ligandos como los oxisteroles. Una vez activados, promueven el transporte extracelular de colesterol con el objetivo de restaurar la homeostasis del colesterol. La activación de esta vía resulta coherente en un contexto de aumento de oxisteroles, como se ha descrito tanto en pacientes como en el modelo murino hSOD1^{G93A}^{127,132}.

Sin embargo, los oxisteroles presentan limitaciones, ya que, además de activar los LXR, inhiben la síntesis de colesterol y han demostrado tener efectos citotóxicos. En este contexto, potenciar farmacológicamente la vía de los LXR mediante agonistas específicos podría representar una estrategia terapéutica prometedora. Esta hipótesis cobra aún más fuerza considerando los efectos beneficiosos que se han atribuido a la activación de los LXR en otras enfermedades neurodegenerativas:

-En Alzheimer: Los LXRs han sido ampliamente estudiados en el contexto del Alzheimer desde que se identificó la variante E4 del gen *APOE*, diana directa de estos receptores, como el principal factor de riesgo genético para las formas esporádicas de la enfermedad²⁰². La eliminación genética de los *Lxr* o de *Abca1* en modelos murinos de Alzheimer provoca un aumento en la acumulación de placas de A β ^{203,204} (REF), posiblemente debido a una menor capacidad de fagocitosis por parte de la microglía²⁰⁵. Diversos estudios han demostrado que los agonistas de los LXR favorecen la eliminación de A β y reducen la carga de placas en estos modelos, todo ello acompañado de una mejora significativa en el rendimiento cognitivo en ratones con Alzheimer^{165,205,206}.

Los efectos beneficiosos de los agonistas de LXR se atribuyen, en gran parte, al aumento de la expresión y lipidación de ApoE. Esta apolipoproteína, además de su papel clave en el metabolismo del colesterol y el mantenimiento de la función sináptica, participa activamente en la eliminación de A β , ya que facilita su captación y degradación por la microglía, así como su transporte desde el cerebro

hacia la periferia a través de la barrera hematoencefálica. Sin embargo, también se han observado mecanismos independientes de Apoe como es promover una mayor supervivencia neuronal. Por ejemplo, un estudio mostró que el tratamiento de ratones 3xTg-AD con el agonista de LXR, GW3965, incrementa la proliferación de precursores neuronales en la zona subgranular²⁰⁷. De manera similar, el uso del agonista TO901317 evitó la pérdida de neuronas colinérgicas en ratones APP/PS1²⁰⁸. En conjunto, todos estos hallazgos respaldan un papel neuroprotector de la activación de los LXRs en el contexto de la enfermedad de Alzheimer.

-En Parkinson: La enfermedad de Parkinson se caracteriza principalmente por la degeneración de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra, un fenómeno que también se observa en ratones *knockout* para *LXR α / β* ²⁰⁹. Además, los ratones deficientes en *LXR β* muestran una mayor vulnerabilidad frente a agentes neurotóxicos como la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP)²¹⁰ (REF) lo que se traduce en una mayor pérdida de neuronas en la sustancia negra tras la exposición a estos compuestos. Cuando se ha tratado con el agonista de los LXR, GW3965, se ha demostrado efectos neuroprotectores en modelos murinos tratados con MPTP, lo que sugiere un posible valor terapéutico de estos compuestos en el contexto del Parkinson²¹⁰. No obstante, aún no está claro si esta neuroprotección depende de mecanismos intrínsecos en las propias neuronas o si se debe principalmente a la acción antiinflamatoria de los LXR en las células gliales, dado que la enfermedad de Parkinson se asocia con una intensa respuesta neuroinflamatoria.

-En Esclerosis múltiple: En el sistema nervioso central, tanto la expresión de *LXR β* como la de varios genes diana de esta vía aumenta durante la diferenciación de los oligodendrocitos. La activación de LXRs mediante el agonista sintético TO901317 induce la expresión de estos genes y favorece la salida de colesterol, lo que indica que los LXRs participan activamente en la regulación de la homeostasis lipídica en los oligodendrocitos²¹¹. En consonancia con estos hallazgos, la eliminación de *LXR α / β* en ratones da lugar a vainas de mielina más delgadas alrededor de los axones de los nervios periféricos, especialmente en aquellos de mayor calibre^{209,212}. Además, estos ratones *knockout* muestran una evolución más grave de la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) en comparación con sus controles, con una desmielinización severa y una infiltración inflamatoria marcada en la médula espinal. Por último, a ratones *wild-type* que se les induce la EAE el tratamiento con agonistas de los LXR han demostrado reducir los síntomas clínicos, la inflamación celular en el sistema nervioso central, la expresión de moléculas del

complejo mayor de histocompatibilidad clase II en la microglía y el grado de desmielinización²⁰⁶.

Con los numerosos resultados beneficiosos que los agonistas de los LXR han demostrado ejercer en las enfermedades neurodegenerativas no es de extrañar que su uso se haya planteado también para la ELA. Además, existen estudios que respaldan el potencial uso terapéutico que los agonistas podrían tener en la ELA:

Los primeros indicios que apuntan a un papel relevante de los LXR en la ELA provienen de estudios realizados en ratones *knockout* para estos genes. Los animales con eliminación simultánea de los genes *LXRα* y *LXRβ* presentan degeneración neuronal acompañada de una acumulación excesiva de lípidos²⁰⁹. Además, estos mismos autores demostraron que la eliminación global de únicamente el gen *LXRβ* (*Lxrb*^{-/-}) en ratones macho conduce al desarrollo de déficits motores, degeneración de motoneuronas y acumulación lipídica²¹³. De manera interesante, en las motoneuronas de la médula espinal de estos ratones, a los ocho meses de edad, se observaron inclusiones citoplasmáticas positivas para Tdp-43. También se ha descrito que una activación anómala de los LXRs en los astrocitos está presente en modelos murinos con mutación en *SOD1*, y se ha propuesto que podría formar parte del mecanismo tóxico inducido por esta proteína mutante²¹⁴.

Sin embargo, los trabajos que hablan del posible papel de los LXRs en la ELA no se limitan únicamente a modelos animales. Un estudio proteómico realizado mediante espectrometría de masas en muestras de plasma mostró una inhibición de la vía de señalización de los LXR en pacientes de ELA²¹⁵. Además, ciertos polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en genes de LXRs se han asociado tanto con la aparición como con la progresión de la enfermedad. En concreto, dos SNPs en *LXRα* (rs2279238 y rs7120118) se correlacionaron con la edad de inicio de la ELA, mientras que un SNP en *LXRβ* (rs2695121) se asoció con la duración de la enfermedad²¹⁶.

Sorprendentemente a pesar de los diversos estudios comentados que sugieren que los LXR pueden ser una interesante diana terapéutica en la ELA actualmente no hay publicado ningún trabajo que analice el efecto de usar los agonistas de los LXR en modelos murinos con mutaciones en genes típicos de ELA y tampoco en pacientes. Los resultados obtenidos en el Bloque 1 más la bibliografía comentada acerca de los LXR y las enfermedades neurodegenerativas y la ELA nos llevaron a realizar un diseño experimental donde ratones hSDO1^{G93A} fueron tratados con el agonista T0 de los LXR desde el estadio presintomático p60. Los resultados desarrollados en el Bloque 2 nos hicieron concluir que tanto en hembras como en machos el tratamiento enlentecía la progresión de la patología reflejado en forma de una pérdida de peso menos acentuada y un menor aumento de la puntuación en la

escala neurológica. Esto era acompañado de un mejor rendimiento motor en diferentes pruebas (*Vertical hanging wire*, test de la fuerza de agarre, rotarod y electromiograma). Por último, la supervivencia se veía significativa mejorada.

Para poner en contexto estas mejorías del uso del agonista T0 decidimos comparar estos resultados con otros estudios en el ratón hSOD1^{G93A} que tenían como diana de forma directa o indirecta el metabolismo de lípidos y en los que la supervivencia se haya visto aumentada de forma significativa (Tabla D1). En nuestro estudio la supervivencia aumentó de media 11 días en hembras y 7 en machos. Este aumento es similar a la mayoría de estudios que han tenido éxito aumentando la supervivencia con dianas lipídicas, siendo la dieta rica en grasas el tratamiento más efectivo con un aumento de 20 días en la supervivencia²¹⁷. En cuanto a los efectos sobre el rendimiento motor se analizaron los datos obtenidos con la prueba del rotarod y se observa que los otros tratamientos o no muestran mejorías o lo hacen en estadios avanzados de la enfermedad al igual que el agonista T0 cuya mejoría en la prueba del rotarod es significativa a p120, pero no a p90.

Por último, quisimos realizar esta misma comparación con los únicos tres tratamientos aprobados en la actualidad para pacientes de ELA: Riluzol, Evaradona y Tofersen (este último solo aprobado en pacientes con mutación en SOD1) (Tabla D1).

El primer fármaco aprobado fue el Riluzol en 1995 por la FDA cuando aún no existían los actuales modelos murinos pre-clínicos para la ELA. Este fármaco aumenta la esperanza de vida unos 6 meses de media y además retrasa la necesidad de usar ventilación asistida. Sorprendentemente, cuando a posteriori de su aprobación se ha evaluado el efecto de este fármaco en el modelo murino hSOD1^{G93A} se ha observado que ni mejora la supervivencia ni la capacidad locomotora^{218,219}.

El segundo fármaco aprobado fue la Edavarona, en 2017 por la FDA. En Europa a día de hoy no se ha llegado aprobar por lo controvertidas que son las supuestas mejoras que ofrece. Este fármaco es un agente antioxidante que en el modelo murino de hSOD1^{G93A} aumenta la supervivencia 6 días de media y mejora la capacidad motora (rotarod) en la fase avanzada de la enfermedad.

El tercer y último fármaco aprobado para la ELA, y en este caso solo para los pacientes que tienen mutado *SOD1* es el Tofersen. Este fármaco es un oligonucleótido antisentido (ASO) diseñado específicamente para reducir la expresión del gen *SOD1* mutado y fue aprobado por la FDA en 2023 y por la EMA en 2024. En ratones hSOD1^{G93A} los primeros ASOs diseñados contra *SOD1* no lograron aumentar la supervivencia ni retrasar el desarrollo de la enfermedad²²⁰. Sin embargo, las nuevas tecnologías para el diseño de ASOs han permitido identificar ASOs contra *SOD1* que en el modelo hSOD1^{G93A} tiene resultados muy prometedores llegando a aumentar en 37 días la esperanza de vida²²¹.

En resumen, en comparación con los tratamientos actuales para la ELA, los resultados mostrados en este trabajo sobre el efecto del agonista T0 en el modelo hSOD1^{G93A} han mostrado mejores beneficios que el Riluzol, la Edavarona y los primeros ASOs contra SOD1 que se diseñaron. Esto resalta la potencialidad de los agonistas de los LXR como diana terapéutica en la ELA.

A) Tratamientos relacionados con lípidos	Aumento en Supervivencia	Rendimiento motor (rotarod)	Ref
Dieta rica en grasas	20 días	No reportado	²¹⁷
Triglicérido cáprico (induce metabolismo cetogénico)	6 días	Mejoría en semanas 14,15 y 16	²²²
Aceite de oliva virgen extra	14 días	Mejoría hasta semana 19	²²³
Inyección intracerebroventricular del gángliosido GM3	6 días	No reportado	¹²⁹
Fingomieloid (agonista funcional de receptores de esfingosina-1-P)	10-15 días	No hay mejoría	²²⁴
Ácido cafeico (inhibidor de síntesis de ácido araquidónico)	8 días	Mejoría en semanas 19,20 y 21	¹⁸⁰
rHlgM12 (anticuerpo contra los gángliosidos GD1a y GT1b)	10 días	No reportado	²²⁵
B) Tratamientos aprobados	Aumento en Supervivencia	Rendimiento motor (rotarod)	Ref
Riluzol	No tiene efecto	No tiene efecto	^{218,219}
Evaradona	6 días	Mejoría en semanas 16,17 y 18	²²⁶
Tofersen	0-37 días	No reportado	²²⁰²²¹

Tabla D1. Resumen de los efectos sobre la supervivencia y el rendimiento en la prueba del rotarod descritos en otros estudios que utilizaron: A) tratamientos que, de forma directa o indirecta, afectan al metabolismo lipídico, y B) tratamientos basados en alguno de los tres fármacos actualmente aprobados para el tratamiento de la ELA en pacientes.”

4 ¿Mediante que mecanismos bioquímicos la potenciación de la vía de señalización de los LXR podría estar resultando beneficiosa en el modelo hSOD1^{G93A}?

Tras demostrar que el agonista T0 ententece la progresión de la enfermedad en el ratón hSOD1^{G93A}, mejora la capacidad motora y aumenta la supervivencia, la pregunta más inmediata es qué mecanismo molecular está mediando estos efectos beneficiosos. Los siguientes pasos de este proyecto se centrarán en tratar de responder a esta cuestión. Sin embargo, gracias a estudios previos de la activación de los LXR en otras patologías y a datos preliminares obtenidos en el laboratorio, es posible formular algunas hipótesis sobre los posibles mecanismos moleculares implicados:

4.1 Homeostasis del colesterol

En la médula espinal, tanto de pacientes con ELA como de modelos animales, se han observado acúmulos de ésteres de colesterol. Esta acumulación podría reflejar un exceso de colesterol intracelular, y es precisamente en este contexto donde los agonistas de los LXR podrían ejercer un papel beneficioso, ya que los LXR son considerados reguladores maestros de la homeostasis del colesterol.

Dado que este mecanismo es el que nos incitó a iniciar el tratamiento con este tipo de compuestos ha sido ampliamente detalladamente durante este trabajo, pero de forma resumida actuaría de la siguiente manera: cuando los niveles intracelulares de colesterol aumentan, resulta esencial activar mecanismos de transporte para expulsar el exceso de colesterol fuera de la célula. Las células detectan este aumento a través de la acumulación de desmosterol (un precursor del colesterol) o de oxisteroles (metabolitos del colesterol), que actúan como ligandos para los LXR. La unión de estos ligandos activa la vía de transporte y eflujo de colesterol mediante la inducción de la expresión de genes como los transportadores de la familia ABC (*ABCA1* y *ABCG1*) y la apolipoproteína E (*APOE*)¹²¹, lo que contribuye a reducir la concentración intracelular de colesterol. Además, los LXR promueven la expresión del gen *IDOL* (*Inducible Degradar of the LDL Receptor*), una ligasa E3-ubiquitina que favorece la degradación del receptor de LDL, disminuyendo así la captación de colesterol y añadiendo una capa adicional de regulación¹²².

¿Cómo comprobaremos si este mecanismo se está activando en nuestro modelo?

En los próximos experimentos se pretende medir la expresión de estos genes diana relacionados con el transporte de colesterol en la médula espinal de ratones

hSOD1^{G93A}, así como realizar análisis lipidómicos para evaluar los niveles de ésteres de colesterol. Los datos preliminares del primer experimento apuntan a una potenciación del transporte de colesterol en los ratones tratados con el agonista, mediante la activación de los genes *Abca1*, *ApoE*, *Abcg1* e *Idol* (datos no mostrados). Sin embargo, será necesario contar con los resultados de la lipidómica para confirmar si esta activación transcripcional se traduce en la reducción esperada de los acúmulos de colesterol.

4.2 Remielinización

Diversos estudios han demostrado que la activación de los LXR favorece la maduración de los oligodendrocitos y promueve los procesos de remielinización. Este efecto se debe, por un lado, a la activación transcripcional de genes clave como *Plp* o *Mbp*, y por otro, a la participación de los LXR en la homeostasis del colesterol, ya que este lípido es un componente esencial para la formación de la vaina de mielina²²⁷.

Estos efectos podrían resultar especialmente relevantes en la patología de la ELA, donde tanto en pacientes como en modelos animales se han descrito alteraciones en la función de los oligodendrocitos. Se ha observado una degeneración de los oligodendrocitos maduros, mientras que las células precursoras, a pesar de mostrar una mayor proliferación, no logran completar su maduración de forma adecuada. Además, en el modelo hSOD1^{G93A} se ha evidenciado que tanto los tractos corticoespinales como la sustancia gris espinal presentan una menor mielinización²²⁸.

¿Cómo comprobaremos si este mecanismo se está activando en nuestro modelo?

Se analizará la expresión de los principales genes implicados en estos procesos en la médula espinal de los ratones hSOD1^{G93A} con y sin tratamiento de T0, como *Plp*, *Mbp* o *Mag*. Este análisis se complementará con una tinción de *Luxol Fast Blue*, que permitirá examinar la integridad de la sustancia blanca en la médula espinal.

4.3 Respuesta antiinflamatoria

Los LXR tienen propiedades antiinflamatorias y son capaces de inhibir la inducción transcripcional de genes proinflamatorios mediada por factores de transcripción clave como NF-κB, AP-1 o STAT-1. En este sentido, se ha demostrado que la activación farmacológica de los LXR atenúa la gravedad de la respuesta

inflamatoria en modelos murinos de aterosclerosis²²⁹, neuroinflamación²³⁰ (REF), dermatitis²³¹, lupus²³² y artritis²³³, inhibiendo la producción primaria de citoquinas.

Además, los LXR pueden modular otros mecanismos integrados que contribuyen al control de la inflamación. En concreto, pueden inducir la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (lcPUFAs), como los ácidos grasos omega-3. La presencia de estos lcPUFAs puede disminuir la transactivación mediada por NF-κB de genes inflamatorios, a través de la modificación de la acetilación de histonas en las regiones reguladoras de dichos genes²³⁴.

Esta acción antiinflamatoria de los LXR podría resultar especialmente relevante en el contexto de la ELA, dado que en la médula espinal de los ratones hSOD1^{G93A} se han descrito potentes procesos de neuroinflamación. Estos se caracterizan por la presencia de una microglía reactiva, productora de citoquinas proinflamatorias; astrocitos activados que liberan factores neurotóxicos para las motoneuronas; y una infiltración linfocitaria.

¿Cómo comprobaremos si este mecanismo se está activando en nuestro modelo?

Para evaluar si el tratamiento con el agonista T0 es capaz de reducir la inflamación, se llevará a cabo un estudio inmunohistoquímico en la médula espinal de ratones hSOD1^{G93A} para evaluar la microgliosis y la astrogliosis midiendo los niveles de Iba1 y Gfap, respectivamente.

4.4 Hiperlipidemia

La activación de la vía de los LXR en el hígado ha demostrado desempeñar un papel clave en el control de la síntesis de ácidos grasos. Entre los genes diana de los LXR se encuentran *SREBP-1C* y *ChREBP*, los cuales, a su vez, activan la expresión de enzimas fundamentales en la lipogénesis, como ACC, FAS y SCD1. Este efecto anabólico es fisiológicamente relevante en situaciones postprandiales, ya que incrementa los niveles de triglicéridos y fosfolípidos en plasma. No obstante, una activación crónica o excesiva de esta vía puede contribuir al desarrollo de esteatosis hepática^{235,236}.

Aunque este efecto hiperlipidémico podría considerarse perjudicial en muchas patologías, en el caso de la ELA se ha descrito que la hiperlipidemia podría tener un efecto protector, ya que aquellos pacientes con niveles elevados de lípidos en sangre presentan una mayor supervivencia^{135,136}.

¿Cómo comprobaremos si este mecanismo se está activando en nuestro modelo?

Para determinar si el tratamiento con el agonista T0 está induciendo este efecto hiperlipidémico, se llevará a cabo un análisis lipidómico de la sangre de ratones hSOD1^{G93A}. Además, se extraerá ARN hepático para analizar la expresión de los genes previamente mencionados: *Srebp-1c*, *ChREBP*, *Acc*, *Fas*, *Scd1*, entre otros.

5 ¿Es la desregulación del colesterol un mecanismo fisiopatológico específico de las mutaciones en *SOD1*? ¿Las hay en otros modelos murinos de ELA?

Dado que solo el 2% de los pacientes de ELA tienen como factor genético una mutación en *SOD1*, si las alteraciones del metabolismo del colesterol se limitan a ser algo específico de ellos su potencial como diana terapéutica disminuiría. Es por ello que se decidió analizar el transcriptoma de la médula espinal de otros dos modelos murinos que posemos en nuestro laboratorio con mutaciones en otros dos genes muy relacionados con la ELA como son *TARDBP* y *FUS*. Además, los dos modelos elegidos a diferencia del hSOD1^{G93A} no son modelos transgénicos en el que se expresan muchas copias del gen humano con la mutación si no que tienen una expresión fisiológica del gen murino en ambos casos. Esto se acerca mejor a las condiciones en la que los humanos expresan la enfermedad.

En el modelo de TDP-43^{M323K} se pudo observar una tendencia muy similar a la del hSOD1^{G93A} con los genes de la síntesis de colesterol que tendían a estar inhibidos mientras que los de transporte de colesterol estaban sobreexpresados. En un reciente trabajo de nuestro grupo con este mismo modelo TDP-43^{M323K} esta misma tendencia de alteraciones del metabolismo del colesterol se ha observado cuando se analizaba transcripcionalmente la corteza en estadios sintomáticos de la patología¹⁵⁵. Además, por lipidómica se pudo observar una acumulación de ésteres de colesterol en la corteza y por western-blot una disminución del ratio entre el Srebp2 nuclear y el Srebp2 precursor. Alteraciones en la misma dirección se han encontrado también en la médula espinal de otro modelo de TDP-43, el transgénico TDP-43^{A315T}, donde se ha observado unos menores niveles de colesterol total y libre en las hembras tanto en estadios presintomáticos como sintomáticos. Estas alteraciones estaban acompañadas de unos menores niveles de la proteína Srebp2 nuclear²³⁷. Curiosamente la delección de TDP-43 en oligodendrocitos genera unos resultados similares: se disminuye la expresión de *SREBF2* y los niveles de colesterol²³⁸. Todos estos datos en su conjunto sugieren que una expresión anómala de TDP-43 podría estar desregulando el metabolismo del colesterol en

parte al modificar los niveles del *master regulator* de la síntesis de colesterol: SREBP2.

En el análisis transcriptómico de la médula espinal del modelo Fusedelta14 no observamos alteraciones significativas en los genes de síntesis o transporte de colesterol lo cual es consecuente con el pequeño número de DEGs totales hallados. Esto puede explicarse porque este modelo concentra la mayoría de sus alteraciones transcripcionales en la corteza cerebral y por tanto en la médula espinal no desarrollan las desregulaciones típicas de otros modelos murinos. Los estudios realizados en modelos murinos de FUS no han reportado en general alteraciones en el metabolismo del colesterol con la excepción del estudio de K Guzman *et al.*, 2020. En este estudio se realizó una deplección condicional del gen FUS en oligodendrocitos y se observó que la expresión de la enzima limitante de la síntesis de colesterol (HMGCR) estaba incrementada en los tractos de sustancia blanca y que esto resultaba en un mayor contenido de colesterol²³⁹.

Por último, un reciente estudio de este mismo año 2025, ha realizado un análisis de RNA-seq a cuatro modelos distintos de ELA (GA-Nes, GA-Camk2a GA-CFP, rNLS8) y a muestras de médula espinal de pacientes. Este estudio transcriptómico ha revelado que en todos ellos la síntesis de colesterol está reprimida mientras que el transporte de colesterol está incrementado²⁴⁰. Estos autores al igual que nosotros sugieren que esto sería una respuesta adaptativa a una acumulación excesiva de colesterol. Estos datos juntos con el meta-análisis de este trabajo y los estudios que deplecionan *FUS* y *TARDBP* en oligodendrocitos ponen de manifiesto que probablemente las alteraciones del metabolismo del colesterol es un mecanismo fisiopatológico común en la ELA y no específico de un gen o mutación concreta.

6 ¿Las alteraciones del metabolismo del colesterol juegan algún papel como causa o modificador de la de la enfermedad o son únicamente consecuencias de los procesos neurodegenerativos?

Las numerosas alteraciones descritas en el metabolismo del colesterol en pacientes con ELA (para revisarlas consultar la sección de la Introducción 3 *Alteraciones del metabolismo lipídico en la ELA*) han sido tradicionalmente consideradas como simples consecuencias de los procesos neurodegenerativos. Esta interpretación se debe, en parte, a que la mayoría de las muestras analizadas corresponden a estadios avanzados de la enfermedad o al estadio final (muestras post-mortem). Sin embargo, los modelos animales permiten estudiar esta patología en fases más tempranas e incluso presintomáticas.

En este contexto, el meta-análisis realizado ha demostrado que el metabolismo del colesterol se encuentra desregulado desde las primeras fases de la enfermedad, identificando incluso la alteración en la expresión del gen *Ch25h* en estadio presintomático. Más importante aún, gracias al tratamiento con un agonista de los LXR, hemos demostrado que la regulación del metabolismo del colesterol actúa como un modificador de la enfermedad en el modelo hSOD1^{G93A}, logrando retrasar la progresión de la patología. Este efecto podría ser extrapolable a humanos, ya que, como se ha comentado anteriormente, se han identificado dos SNPs en LXR α (rs2279238 y rs7120118) que se correlacionan con la edad de inicio de la ELA, y un SNP en LXR β (rs2695121) que se asocia con la duración de la enfermedad. Otros hallazgos que respaldan este papel modulador del metabolismo del colesterol provienen de estudios que han descrito que niveles elevados de LDL en sangre se asocian con una mayor supervivencia en pacientes con ELA^{135,136}.

No obstante, la cuestión de si las alteraciones en el metabolismo del colesterol podrían desempeñar un papel causal en la ELA, más allá de ser simples modificadores o consecuencias, sigue siendo un tema abierto en el campo. Para explorar esta posibilidad, en este trabajo se decidió llevar a cabo un estudio de *Mendelian Randomization* (MR), un enfoque estadístico utilizado en epidemiología genética para inferir relaciones causales entre un factor de riesgo y una enfermedad, utilizando variantes genéticas como instrumentos. En este análisis de MR se seleccionaron varios factores lipídicos para evaluar su posible efecto causal en la ELA. Como resultado, se observó que tanto los niveles elevados de colesterol total como de LDL se asocian con un mayor riesgo de desarrollar ELA.

Previamente, un estudio de GWAS ya había identificado el gen *CYP27A1*, implicado en la síntesis del oxiesteroles 27-hidroxicolesterol, como un gen que confiere susceptibilidad a padecer ELA¹⁹⁸. Actualmente, se ha desarrollado una variante de

estos estudios, denominada EWAS (*Epigenome-Wide Association Study*), que, al igual que los GWAS, busca identificar asociaciones entre factores genéticos y enfermedad, pero centrándose en modificaciones epigenéticas en lugar de en variantes genéticas como los SNPs. Este enfoque se ha aplicado en pacientes con ELA para identificar regiones del genoma diferencialmente metiladas. En este contexto, se identificaron un total de 45 posiciones diferencialmente metiladas (DMPs), anotadas a 42 genes, los cuales se encuentran enriquecidos en rutas y procesos relacionados con el metabolismo, la biosíntesis de colesterol y la respuesta inmunitaria. La vía del metabolismo del colesterol se identificó principalmente gracias a la alteración epigenética de cuatro genes: *DHCR24*, *ABCG1*, *MSMO1* y *SLC7A11*. El gen *MSMO1* codifica una enzima necesaria en una etapa intermedia de la síntesis de colesterol, mientras que *DHCR24* codifica la enzima responsable de la etapa final, convirtiendo el desmosterol en colesterol. Por su parte, *ABCG1* codifica una proteína de membrana implicada en el transporte de colesterol hacia el medio extracelular. Estos hallazgos refuerzan la hipótesis de que las alteraciones en la síntesis o el transporte del colesterol pueden conferir susceptibilidad a desarrollar ELA.

Conclusiones

Conclusiones

1. La médula espinal de los modelos de ratón transgénicos con mutaciones en *SOD1* presenta una marcada desregulación transcripcional desde los 3 meses de edad, coincidente con el inicio de las alteraciones motoras, que incrementa conforme progresa la enfermedad. La desregulación de las principales rutas lipídicas en médula (la de colesterol, esfingolípidos y eicosanoides) puede ser un evento muy inicial en la enfermedad, que podría desencadenar otros procesos degenerativos y disfuncionales posteriores.
2. El metabolismo de los esfingolípidos se encuentra alterado de forma temprana, caracterizado por la desregulación del catabolismo de glicoesfingolípidos complejos y de la síntesis de esfingosina-1-fosfato, así como por la represión en la producción de glicoesfingolípidos complejos.
3. El metabolismo de eicosanoides se ve alterado tanto por un aumento en la expresión del gen que controla la síntesis de ácido araquidónico como de los genes que participan en la generación de sus derivados, incluidas prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos y lipoxinas.
4. El metabolismo del colesterol endógeno en la médula espinal de los ratones mutantes *SOD1* se encuentra alterado desde estadios muy iniciales de la sintomatología. Nuestros datos sugieren un intento de reprimir la biosíntesis endógena de colesterol al tiempo que se potencia su exportación y transporte extracelular, lo que podría representar una respuesta compensatoria frente a un acúmulo de colesterol en la médula. En este contexto, modular dicha desregulación del colesterol endógeno desde fases iniciales de la enfermedad podría constituir una estrategia terapéutica prometedora para frenar, al menos en parte, la progresión de la ELA.
5. La modulación del metabolismo del colesterol mediante agonistas de los receptores LXR (Liver X Receptors) se perfila como una estrategia terapéutica prometedora por varias razones: (a) la suplementación dietética con moduladores de los LXR en ratones *hSOD1^{G93A}* permite alcanzar concentraciones efectivas en la médula espinal, activar los genes diana de LXR y no genera efectos secundarios adversos; (b) retrasa la progresión de la enfermedad, atenuando la pérdida de peso y la discapacidad neurológica; (c) mitiga el deterioro de la función motora, incluyendo la fuerza de agarre, la coordinación locomotora y la respuesta electrofisiológica muscular; y (d) prolonga de manera significativa la supervivencia.

6. Las alteraciones del metabolismo del colesterol en la médula espinal no son algo exclusivas de los modelos animales con mutaciones en SOD1, ya que el análisis transcriptómico de la médula espinal del modelo TDP-43^{M323K} ha revelado cambios similares. Este hallazgo refuerza el potencial de esta vía como una posible diana terapéutica en la ELA.

7. Por último, la desregulación del metabolismo del colesterol podría no solo estar implicada en el desarrollo de la enfermedad, sino también tener un papel causal en la misma. Esto se sustenta en los resultados del *Mendelian Randomization*, los cuales han demostrado que los factores genéticos asociados a niveles elevados de LDL en sangre se relacionan con un mayor riesgo de desarrollar ELA.

Referencias

1. Masrori, P. & Van Damme, P. Amyotrophic lateral sclerosis: a clinical review. *Eur. J. Neurol.* **2020**, 1918–1929 (2020).
2. Ringholz, G. M. *et al.* Prevalence and patterns of cognitive impairment in sporadic ALS. *Neurology* **65**, 586–590 (2005).
3. Bochevarov, A. D. *et al.* Jaguar: A high-performance quantum chemistry software program with strengths in life and materials sciences. *Int. J. Quantum Chem.* **113**, 2110–2142 (2013).
4. Longinetti, E. & Fang, F. Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: An update of recent literature. *Current Opinion in Neurology* **32**, 771–776 (2019).
5. Manjaly, Z. R. *et al.* The sex ratio in amyotrophic lateral sclerosis: A population based study Europe PMC Funders Group. *Amyotroph Lateral Scler* **11**, 439–442 (2010).
6. Grassano, M. *et al.* Sex Differences in Amyotrophic Lateral Sclerosis Survival and Progression: A Multidimensional Analysis. *Ann. Neurol.* **96**, 159–169 (2024).
7. Kirby, J., Al Sultan, A., Waller, R. & Heath, P. The genetics of amyotrophic lateral sclerosis: current insights. *Degener. Neurol. Neuromuscul. Dis.* **49** (2016). doi:10.2147/dnnd.s84956
8. Chen, S., Sayana, P., Zhang, X. & Le, W. Genetics of amyotrophic lateral sclerosis: An update. *Molecular Neurodegeneration* **8**, (2013).
9. Trojsi, F. *et al.* ALS Genetics, Mechanisms, and Therapeutics: Where Are We Now? (2019). doi:10.3389/fnins.2019.01310
10. Laferrièrea, F. & PolymenidouPhD, M. Advances and challenges in understanding the multifaceted pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Swiss Med. Wkly.* **145**, w14054–w14054 (2015).
11. Sutedja, N. A. *et al.* Exposure to chemicals and metals and risk of amyotrophic lateral sclerosis: A systematic review. *Amyotroph. Lateral Scler.* **10**, 302–309 (2009).
12. Al-Chalabi, A. & Hardiman, O. The epidemiology of ALS: A conspiracy of genes, environment and time. *Nat. Rev. Neurol.* **9**, 617–628 (2013).
13. Sutedja, N. A. *et al.* What we truly know about occupation as a risk factor for ALS: A critical and systematic review. *Amyotroph. Lateral Scler.* **10**, 295–301 (2009).
14. Coffman, C. J., Horner, R. D., Grambow, S. C. & Lindquist, J. Estimating the Occurrence of Amyotrophic Lateral Sclerosis among Gulf War (1990–1991) Veterans Using Capture-Recapture Methods. *Neuroepidemiology* **24**, 141–150 (2005).
15. Re, D. B. *et al.* A perspective on persistent toxicants in veterans and amyotrophic lateral sclerosis: identifying exposures determining higher ALS risk. *J. Neurol.* **269**, 2359–2377 (2022).
16. Huisman, M. H. B. *et al.* Lifetime physical activity and the risk of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **84**, 976–981 (2013).
17. Chiò, A., Benzi, G., Dossena, M., Mutani, R. & Mora, G. Severely increased risk of amyotrophic lateral sclerosis among Italian professional football players. *Brain* **128**, 472–476 (2005).
18. Ragagnin, A. M. G., Shadfar, S., Vidal, M., Jamali, M. S. & Atkin, J. D. Motor Neuron Susceptibility in ALS/FTD. *Front. Neurosci.* **13**, (2019).

19. Nijssen, J., Comley, L. H. & Hedlund, E. Motor neuron vulnerability and resistance in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol.* **133**, 863–885 (2017).
20. Armon, C. Sports and trauma in amyotrophic lateral sclerosis revisited. *J. Neurol. Sci.* **262**, 45–53 (2007).
21. Okamoto, K. *et al.* Nutritional status and risk of amyotrophic lateral sclerosis in Japan. *Amyotroph. Lateral Scler.* **8**, 300–304 (2007).
22. Pupillo, E. *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis and food intake. *Amyotroph. Lateral Scler. Front. Degener.* **19**, 267–274 (2018).
23. Al-Chalabi, A. *et al.* Analysis of amyotrophic lateral sclerosis as a multistep process: a population-based modelling study. *Lancet Neurol.* **13**, 1108–13 (2014).
24. Mead, R. J., Shan, N., Reiser, H. J., Marshall, F. & Shaw, P. J. Amyotrophic lateral sclerosis: a neurodegenerative disorder poised for successful therapeutic translation. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2022** *223* **22**, 185–212 (2022).
25. Majcher, V., Goode, A., James, V. & Layfield, R. Autophagy receptor defects and ALS-FTLD. *Mol. Cell. Neurosci.* **66**, 43–52 (2015).
26. Ying, H. & Yue, B. Y. J. T. Optineurin: The autophagy connection. *Exp. Eye Res.* **144**, 73–80 (2016).
27. Nassif, M., Woehlbier, U. & Manque, P. A. The Enigmatic Role of C9ORF72 in Autophagy. *Autophagy. Front. Neurosci* **11**, 442 (2017).
28. Conicella, A. E., Zerze, G. H., Mittal, J. & Fawzi, N. L. ALS Mutations Disrupt Phase Separation Mediated by α -Helical Structure in the TDP-43 Low-Complexity C-Terminal Domain. *Structure* **24**, 1537–1549 (2016).
29. Zhou, Y., Liu, S., Öztürk, A. & Hicks, G. G. FUS-regulated RNA metabolism and DNA damage repair. *Rare Dis.* **2**, e29515 (2014).
30. Hill, S. J. *et al.* Two familial ALS proteins function in prevention/repair of transcription-associated DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, E7701–E7709 (2016).
31. Mastrocola, A. S., Kim, S. H., Trinh, A. T., Rodenkirch, L. A. & Tibbetts, R. S. The RNA-binding protein fused in sarcoma (FUS) functions downstream of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in response to DNA damage. *J. Biol. Chem.* **288**, 24731–24741 (2013).
32. Wang, W. Y. *et al.* Interaction of FUS and HDAC1 regulates DNA damage response and repair in neurons. *Nat. Neurosci.* **16**, 1383–1391 (2013).
33. Magrané, J., Cortez, C., Gan, W. B. & Manfredi, G. Abnormal mitochondrial transport and morphology are common pathological denominators in SOD1 and TDP43 ALS mouse models. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 1413–1424 (2014).
34. Stoica, R. *et al.* ALS / FTD -associated FUS activates GSK -3 β to disrupt the VAPB – PTPIP 51 interaction and ER –mitochondria associations. *EMBO Rep.* **17**, 1326–1342 (2016).
35. Stoica, R. *et al.* ER–mitochondria associations are regulated by the VAPB–PTPIP51 interaction and are disrupted by ALS/FTD-associated TDP-43. *Nat. Commun.* **2014** *51* **5**, 1–12 (2014).
36. Lopez-Gonzalez, R. *et al.* Poly(GR) in C9ORF72-Related ALS/FTD Compromises Mitochondrial Function and Increases Oxidative Stress and DNA Damage in iPSC-Derived Motor Neurons. *Neuron* **92**, 383–391 (2016).
37. Genin, E. C. *et al.* CHCHD 10 mutations promote loss of mitochondrial cristae junctions with impaired mitochondrial genome maintenance and inhibition of apoptosis. *EMBO Mol. Med.* **8**, 58–72 (2016).

38. Komine, O. & Yamanaka, K. Neuroinflammation in motor neuron disease. *Nagoya J. Med. Sci.* **77**, 537 (2015).
39. Irwin, D., Lippa, C. F. & Rosso, A. Progranulin (PGRN) expression in ALS: An immunohistochemical study. *J. Neurol. Sci.* **276**, 9–13 (2009).
40. Freischmidt, A. *et al.* Haploinsufficiency of TBK1 causes familial ALS and frontotemporal dementia. *Nat. Neurosci.* **2015** *185* **18**, 631–636 (2015).
41. Lall, D. & Baloh, R. H. Microglia and C9orf72 in neuroinflammation and ALS and frontotemporal dementia. *J. Clin. Invest.* **127**, 3250–3258 (2017).
42. Liu, J. & Wang, F. Role of neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: Cellular mechanisms and therapeutic implications. *Front. Immunol.* **8**, (2017).
43. Kang, S. H. *et al.* Degeneration and impaired regeneration of gray matter oligodendrocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Neurosci.* **16**, 571–579 (2013).
44. Lee, Y. *et al.* Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature* **487**, 443–448 (2012).
45. Laslo, P., Lipski, J., Nicholson, L. F. B., Miles, G. B. & Funk, G. D. GluR2 AMPA receptor subunit expression in motoneurons at low and high risk for degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Exp. Neurol.* **169**, 461–471 (2001).
46. Boston-Howes, W. *et al.* Caspase-3 cleaves and inactivates the glutamate transporter EAAT2. *J. Biol. Chem.* **281**, 14076–14084 (2006).
47. Wang, S. J., Wang, K. Y. & Wang, W. C. Mechanisms underlying the riluzole inhibition of glutamate release from rat cerebral cortex nerve terminals (synaptosomes). *Neuroscience* **125**, 191–201 (2004).
48. Kretschmer, B. D., Kratzer, U. & Schmidt, W. J. Riluzole, a glutamate release inhibitor, and motor behavior. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **358**, 181–190 (1998).
49. Smith, B. N. *et al.* Exome-wide rare variant analysis identifies TUBA4A mutations associated with familial ALS. *Neuron* **84**, 324–331 (2014).
50. Wu, C. H. *et al.* Mutations in the profilin 1 gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* **488**, 499–503 (2012).
51. Garcia, M. L. *et al.* Mutations in neurofilament genes are not a significant primary cause of non-SOD1-mediated amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Dis.* **21**, 102–109 (2006).
52. Miller, R. G., Mitchell, J. D. & Moore, D. H. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane Database Syst. Rev.* **2012**, (2012).
53. Zoccolella, S. *et al.* Riluzole and amyotrophic lateral sclerosis survival: A population-based study in southern Italy. *Eur. J. Neurol.* **14**, 262–268 (2007).
54. Abe, K. *et al.* Safety and efficacy of edaravone in well defined patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol.* **16**, 505–512 (2017).
55. Abe, K. *et al.* Confirmatory double-blind, parallel-group, placebo-controlled study of efficacy and safety of edaravone (MCI-186) in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Amyotroph. Lateral Scler. Front. Degener.* **15**, 610–617 (2014).
56. Hardiman, O. & van den Berg, L. H. Edaravone: a new treatment for ALS on the horizon? *Lancet Neurol.* **16**, 490–491 (2017).
57. Ashraf Hamad, A. & Alkhaldeh, I. M. Tofersen for SOD1 amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Rev. Artic. Neurol. Sci.* **46**, 1977–1985 (2025).
58. Rosen, D. R. *et al.* Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with

- familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* **362**, 59–62 (1993).
59. Mccords, J. M. & Fridovich, I. Superoxide Dismutase AN ENZYMIC FUNCTION FOR ERYTHROCUPREIN (HEMOCUPREIN)*. *J. BIOLOGICAL CHEMISTRY* **244**, 6049–6065 (1969).
 60. Zou, Z. Y. *et al.* Genetic epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **88**, 540–549 (2017).
 61. Yamashita, S. & Ando, Y. Genotype-phenotype relationship in hereditary amyotrophic lateral sclerosis. *Transl. Neurodegener.* **4**, (2015).
 62. Douglas, A. G. L. & Baralle, D. Reduced penetrance of gene variants causing amyotrophic lateral sclerosis. *J. Med. Genet.* **61**, 294–297 (2023).
 63. Vázquez-Costa, J. F. *et al.* Characterizing SOD1 mutations in Spain: The impact of genotype, age and sex in the natural history of the disease. *Eur. J. Neurol.* **30**, 861–871 (2023).
 64. Li, H. F. & Wu, Z. Y. Genotype-phenotype correlations of amyotrophic lateral sclerosis. *Transl. Neurodegener.* **5**, (2016).
 65. Dalla Bella, E. *et al.* Behavioral and Cognitive Phenotypes of Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis Carrying SOD1 Variants. *Neurology* **99**, E2052–E2062 (2022).
 66. Deng, H. X. *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase. *Science (80-.)*. **261**, 1047–1051 (1993).
 67. Reaume, A. G. *et al.* Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat. Genet.* **13**, 43–47 (1996).
 68. Bunton-Stasyshyn, R. K. A., Saccon, R. A., Fratta, P. & Fisher, E. M. C. SOD1 Function and Its Implications for Amyotrophic Lateral Sclerosis Pathology: New and Renascent Themes. *Neuroscientist* **21**, 519–529 (2015).
 69. Gurney, M. E. *et al.* Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science (80-.)*. **264**, 1772–1775 (1994).
 70. Pfohl, S. R., Halicek, M. T. & Mitchell, C. S. Characterization of the Contribution of Genetic Background and Gender to Disease Progression in the SOD1 G93A Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Meta-Analysis. *J. Neuromuscul. Dis.* **2**, 137–150 (2015).
 71. Pun, S., Santos, A. F., Saxena, S., Xu, L. & Caroni, P. Selective vulnerability and pruning of phasic motoneuron axons in motoneuron disease alleviated by CNTF. *Nat. Neurosci.* **9**, 408–419 (2006).
 72. Fischer, L. R. *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: Evidence in mice and man. *Exp. Neurol.* **185**, 232–240 (2004).
 73. Dal Canto, M. C. & Gurney, M. E. Neuropathological changes in two lines of mice carrying a transgene for mutant human Cu,Zn SOD, and in mice overexpressing wild type human SOD: a model of familial amyotrophic lateral sclerosis (FALS). *Brain Res.* **676**, 25–40 (1995).
 74. Mourelatos, Z., Gonatas, N. K., Stieber, A., Gurney, M. E. & Dal Canto, M. C. The Golgi apparatus of spinal cord motor neurons in transgenic mice expressing mutant Cu,Zn superoxide dismutase becomes fragmented in early, preclinical stages of the disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 5472–5477 (1996).
 75. Johnston, J. A., Dalton, M. J., Gurney, M. E. & Kopito, R. R. Formation of high molecular weight complexes of mutant Cu,Zn-superoxide dismutase in a mouse model for familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 12571–12576 (2000).
 76. Zang, D. W. & Cheema, S. S. Degeneration of corticospinal and bulbospinal systems in

- the superoxide dismutase 1G93A G1H transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci. Lett.* **332**, 99–102 (2002).
77. Turner, B. J. & Talbot, K. Transgenics, toxicity and therapeutics in rodent models of mutant SOD1-mediated familial ALS. *Prog. Neurobiol.* **85**, 94–134 (2008).
 78. Tracey, T. J., Steyn, F. J., Wolvetang, E. J. & Ngo, S. T. Neuronal Lipid Metabolism: Multiple Pathways Driving Functional Outcomes in Health and Disease. *Front. Mol. Neurosci.* **11**, 10 (2018).
 79. Yoon, J. H. *et al.* Brain lipidomics: From functional landscape to clinical significance. *Sci. Adv.* **8**, (2022).
 80. Vallés, A. S. & Barrantes, F. J. The synaptic lipidome in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1864**, (2022).
 81. Osetrova, M. *et al.* Lipidome atlas of the adult human brain. *Nat. Commun.* **15**, (2024).
 82. Tracey, T. J., Kirk, S. E., Steyn, F. J. & Ngo, S. T. The role of lipids in the central nervous system and their pathological implications in amyotrophic lateral sclerosis. *Semin. Cell Dev. Biol.* **112**, 69–81 (2021).
 83. Jiménez-Rojo, N. & Riezman, H. On the road to unraveling the molecular functions of ether lipids. *FEBS Lett.* **593**, 2378–2389 (2019).
 84. Montaner, A. *et al.* Specific Phospholipids Regulate the Acquisition of Neuronal and Astroglial Identities in Post-Mitotic Cells OPEN. (2018). doi:10.1038/s41598-017-18700-4
 85. Saher, G. *et al.* High cholesterol level is essential for myelin membrane growth. *Nat. Neurosci.* **8**, 468–475 (2005).
 86. Walther, T. C. & Farese, R. V. The life of lipid droplets. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1791**, 459–466 (2009).
 87. Bogie, J. F. J., Haidar, M., Kooij, G. & Hendriks, J. J. A. Fatty acid metabolism in the progression and resolution of CNS disorders. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **159**, 198–213 (2020).
 88. Castillo, R. I. *et al.* From molecules to the clinic: Linking schizophrenia and metabolic syndrome through sphingolipids metabolism. *Front. Neurosci.* **10**, (2016).
 89. Hannun, Y. A. & Obeid, L. M. Principles of bioactive lipid signalling: Lessons from sphingolipids. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 139–150 (2008).
 90. Slotte, J. P. Biological functions of sphingomyelins. *Prog. Lipid Res.* **52**, 424–437 (2013).
 91. Hannun, Y. A. & Obeid, L. M. Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 175–191 (2018).
 92. Schnarr, R. L. & Kinoshita, T. Glycosphingolipids. *Essentials Glycobiol.* **5**, 1–12 (2015).
 93. Rabbo, M. A., Khodour, Y., Kaguni, L. S. & Stiban, J. Sphingolipid lysosomal storage diseases: from bench to bedside. doi:10.1186/s12944-021-01466-0
 94. Bsci, D. T., Kaur Msc, G., Weisinger, R. S. & Sinclair, A. J. The role of eicosanoids in the brain. *Asia Pac J Clin Nutr* **17**, 220–228 (2008).
 95. Farooqui, A. A., Horrocks, L. A. & Farooqui, T. Modulation of inflammation in brain: A matter of fat. *J. Neurochem.* **101**, 577–599 (2007).
 96. Phillis, J. W., Horrocks, L. A. & Farooqui, A. A. Cyclooxygenases, lipoxygenases, and epoxygenases in CNS: Their role and involvement in neurological disorders. *Brain Res. Rev.* **52**, 201–243 (2006).
 97. Leone, S., Ottani, A. & Bertolini, A. Dual Acting Anti-Inflammatory Drugs. *Curr. Top. Med. Chem.* **7**, 265–275 (2007).

98. Chandrasekharan, J. A. & Sharma-Wali, N. Lipoxins: Nature's way to resolve inflammation. *J. Inflamm. Res.* **8**, 181–192 (2015).
99. Dietschy, J. M. Central nervous system: Cholesterol turnover, brain development and neurodegeneration. *Biol. Chem.* **390**, 287–293 (2009).
100. Saher, G. & Stumpf, S. K. Cholesterol in myelin biogenesis and hypomyelinating disorders. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1851**, 1083–1094 (2015).
101. Renner, M., Choquet, D. & Triller, A. Control of the postsynaptic membrane viscosity. *J. Neurosci.* **29**, 2926–2937 (2009).
102. Sviridov, D. & Miller, Y. I. Biology of lipid rafts: Introduction to the thematic review series. *J. Lipid Res.* **61**, 598–600 (2020).
103. Brown, M. S., Radhakrishnan, A. & Goldstein, J. L. Retrospective on Cholesterol Homeostasis: The Central Role of Scap. *Annu. Rev. Biochem.* **87**, 783–807 (2018).
104. Ikonen, E. & Zhou, X. Cholesterol transport between cellular membranes: A balancing act between interconnected lipid fluxes. *Dev. Cell* **56**, 1430–1436 (2021).
105. Platt, F. M. *et al.* Disorders of cholesterol metabolism and their unanticipated convergent mechanisms of disease. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **15**, 173 (2014).
106. Björkhem, I., Leoni, V. & Meaney, S. Genetic connections between neurological disorders and cholesterol metabolism. *J. Lipid Res.* **51**, 2489 (2010).
107. Shin, K. C., Ali Moussa, H. Y. & Park, Y. Cholesterol imbalance and neurotransmission defects in neurodegeneration. *Exp. Mol. Med.* **56**, 1685–1690 (2024).
108. Godoy-Corchuelo, J. M. *et al.* Lipid Metabolic Alterations in the ALS-FTD Spectrum of Disorders. *Biomedicines* **10**, (2022).
109. Orth, M. & Bellostta, S. Cholesterol: Its regulation and role in central nervous system disorders. *Cholesterol* **2012**, (2012).
110. Martin, M., Dotti, C. G. & Ledesma, M. D. Brain cholesterol in normal and pathological aging. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1801**, 934–944 (2010).
111. Dietschy, J. M. & Turley, S. D. Thematic review series: brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J. Lipid Res.* **45**, 1375–1397 (2004).
112. Espenshade, P. J. & Hughes, A. L. Regulation of sterol synthesis in eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* **41**, 401–427 (2007).
113. Xu, Q. *et al.* Profile and regulation of apolipoprotein E (ApoE) expression in the CNS in mice with targeting of green fluorescent protein gene to the ApoE locus. *J. Neurosci.* **26**, 4985–4994 (2006).
114. Rebeck, G. W., LaDu, M. J., Estus, S., Bu, G. & Weeber, E. J. The generation and function of soluble apoE receptors in the CNS. *Mol. Neurodegener.* **1**, (2006).
115. Hauser, P. S., Narayanaswami, V. & Ryan, R. O. Apolipoprotein E: From lipid transport to neurobiology. *Prog. Lipid Res.* **50**, 62–74 (2011).
116. Schroepfer, G. J. & Wilson, W. K. Oxysterols: Modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiol. Rev.* **80**, 361–554 (2000).
117. Zhang, J. & Liu, Q. Cholesterol metabolism and homeostasis in the brain. *Protein Cell* **6**, 254–264 (2015).
118. Zhu, R., Ou, Z., Ruan, X. & Gong, J. Role of liver X receptors in cholesterol efflux and inflammatory signaling (review). *Mol. Med. Rep.* **5**, 895–900 (2012).
119. Walther, T. C. & Farese, R. V. Lipid droplets and cellular lipid metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* **81**, 687–714 (2012).

120. Ho, W. Y., Hartmann, H. & Ling, S. C. Central nervous system cholesterol metabolism in health and disease. *IUBMB Life* **74**, 826–841 (2022).
121. Wang, B. & Tontonoz, P. Liver X receptors in lipid signalling and membrane homeostasis. *Nat. Rev. Endocrinol.* **14**, 452–463 (2018).
122. Courtney, R. & Landreth, G. E. LXR Regulation of Brain Cholesterol: From Development to Disease. *Trends Endocrinol. Metab.* **27**, 404–414 (2016).
123. Mouzat, K. *et al.* Regulation of brain cholesterol: What role do liver X receptors play in neurodegenerative diseases? *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
124. Hartmann, H., Ho, W. Y., Chang, J. C. & Ling, S. C. Cholesterol dyshomeostasis in amyotrophic lateral sclerosis: cause, consequence, or epiphenomenon? *FEBS J.* **289**, 7688–7709 (2022).
125. Cutler, R. G., Pedersen, W. A., Camandola, S., Rothstein, J. D. & Mattson, M. P. Evidence that accumulation of ceramides and cholesterol esters mediates oxidative stress - Induced death of motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* **52**, 448–457 (2002).
126. Dodge, J. C. *et al.* Neutral lipid cacostasis contributes to disease pathogenesis in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurosci.* **40**, 9137–9147 (2020).
127. Dodge, J. C., Yu, J., Sardi, S. P. & Shihabuddin, L. S. Sterol auto-oxidation adversely affects human motor neuron viability and is a neuropathological feature of amyotrophic lateral sclerosis. *Sci. Rep.* **11**, (2021).
128. Hanrieder, J. & Ewing, A. G. Spatial elucidation of spinal cord lipid- and metabolite-Regulations in amyotrophic lateral sclerosis. *Sci. Rep.* **4**, (2014).
129. Dodge, J. C. *et al.* Glycosphingolipids are modulators of disease pathogenesis in amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 8100–8105 (2015).
130. Andrés-Benito, P. *et al.* Lipid alterations in human frontal cortex in ALS-FTLD-TDP43 proteinopathy spectrum are partly related to peroxisome impairment. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **47**, 544–563 (2021).
131. Abdel-Khalik, J. *et al.* Defective cholesterol metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Lipid Res.* **58**, 267–278 (2017).
132. Kim, S. M. *et al.* 25-Hydroxycholesterol is involved in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Oncotarget* **8**, 11855 (2017).
133. Henriques, A. *et al.* Inhibition of β -Glucocerebrosidase Activity Preserves Motor Unit Integrity in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Sci. Rep.* **7**, (2017).
134. Sol, J. *et al.* Lipidomic traits of plasma and cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis correlate with disease progression. *Brain Commun.* **3**, (2021).
135. Dupuis, L. *et al.* Dyslipidemia is a protective factor in amyotrophic lateral sclerosis symbol. *Neurology* **70**, 1004–1009 (2008).
136. Ingre, C. *et al.* Lipids, apolipoproteins, and prognosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* **94**, E1835–E1844 (2020).
137. Chelstowska, B., Barańczyk-Kuźma, A. & Kuźma-Kozakiewicz, M. Dyslipidemia in patients with amyotrophic lateral sclerosis—a case control retrospective study. *Amyotroph. Lateral Scler. Front. Degener.* **22**, 195–205 (2021).
138. Dorst, J. *et al.* Patients with elevated triglyceride and cholesterol serum levels have a prolonged survival in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol.* **258**, 613–617 (2011).
139. Area-Gomez, E. *et al.* Lipidomics study of plasma from patients suggest that ALS and PLS are part of a continuum of motor neuron disorders. *Sci. Rep.* **11**, 13562 (2021).

140. FernÁndez-Eulate, G. *et al.* A comprehensive serum lipidome profiling of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph. Lateral Scler. Front. Degener.* **21**, 252–262 (2020).
141. Goutman, S. A. *et al.* Metabolomics identifies shared lipid pathways in independent amyotrophic lateral sclerosis cohorts. *Brain* **145**, 4425–4439 (2022).
142. Nodera, H. *et al.* Frequent hepatic steatosis in amyotrophic lateral sclerosis: Implication for systemic involvement. *Neurol. Clin. Neurosci.* **3**, 58–62 (2015).
143. Sapaly, D. *et al.* Dysregulation of muscle cholesterol transport in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* **148**, 788–802 (2025).
144. Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y. & Gu, J. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics* **34**, i884–i890 (2018).
145. Kim, D., Paggi, J. M., Park, C., Bennett, C. & Salzberg, S. L. Graph-Based Genome Alignment and Genotyping with HISAT2 andHISAT-genotype. *Nat. Biotechnol.* **37**, 907 (2019).
146. Liao, Y., Smyth, G. K. & Shi, W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* **30**, 923–930 (2014).
147. Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **15**, (2014).
148. Wu, T. *et al.* clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data. *Innovation* **2**, 100141 (2021).
149. Rau, A., Marot, G. & Jaffrézic, F. Differential meta-analysis of RNA-seq data from multiple studies. *BMC Bioinformatics* **15**, (2014).
150. Szklarczyk, D. *et al.* STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res.* **47**, D607–D613 (2019).
151. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
152. Rodríguez-Cueto, C. *et al.* Neuroprotective effects of the cannabigerol quinone derivative VCE-003.2 in SOD1G93A transgenic mice, an experimental model of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem. Pharmacol.* **157**, 217–226 (2018).
153. Pollari, E., Prior, R., Robberecht, W., Van Damme, P. & Van Den Bosch, L. In vivo electrophysiological measurement of compound muscle action potential from the forelimbs in mouse models of motor neuron degeneration. *J. Vis. Exp.* **2018**, (2018).
154. Fernández-Beltrán, L. C. *et al.* A transcriptomic meta-analysis shows lipid metabolism dysregulation as an early pathological mechanism in the spinal cord of sod1 mice. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, (2021).
155. García-Toledo, I. *et al.* TDP-43 dysregulation impairs cholesterol metabolism linked with myelination defects . (2025). doi:10.21203/RS.3.RS-6256163/V1
156. Ali, Z. *et al.* Mutation in the FUS nuclear localisation signal domain causes neurodevelopmental and systemic metabolic alterations. *DMM Dis. Model. Mech.* **16**, (2023).
157. Nicolas, A. *et al.* Genome-wide Analyses Identify KIF5A as a Novel ALS Gene. *Neuron* **97**, 1268-1283.e6 (2018).
158. Hemani, G. *et al.* The MR-base platform supports systematic causal inference across the human phenome. *Elife* **7**, (2018).
159. Burgess, S., Butterworth, A. & Thompson, S. G. Mendelian randomization analysis with multiple genetic variants using summarized data. *Genet. Epidemiol.* **37**, 658–665 (2013).

160. Chaves-Filho, A. B. *et al.* Alterations in lipid metabolism of spinal cord linked to amyotrophic lateral sclerosis. *Sci. Rep.* **9**, (2019).
161. Xu, P. *et al.* LXR agonists: New potential therapeutic drug for neurodegenerative diseases. *Mol. Neurobiol.* **48**, 715–728 (2013).
162. Koldamova, R. P. *et al.* The liver X receptor ligand T0901317 decreases amyloid β production in vitro and in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* **280**, 4079–4088 (2005).
163. Riddell, D. R. *et al.* The LXR agonist T0901317 selectively lowers hippocampal A β 42 and improves memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Mol. Cell. Neurosci.* **34**, 621–628 (2007).
164. Cui, G. *et al.* Liver X receptor (LXR) mediates negative regulation of mouse and human Th17 differentiation. *J. Clin. Invest.* **121**, 658–670 (2011).
165. Vanmierlo, T. *et al.* Liver X receptor activation restores memory in aged AD mice without reducing amyloid. *Neurobiol. Aging* **32**, 1262–1272 (2011).
166. Fitz, N. F. *et al.* Improvement of memory deficits and A β clearance in aged APP23 mice treated with a combination of anti-A β antibody and LXR agonist HHS Public Access. *J Alzheimers Dis* **41**, 535–549 (2014).
167. Fitz, N. F. *et al.* Neurobiology of Disease Liver X Receptor Agonist Treatment Ameliorates Amyloid Pathology and Memory Deficits Caused by High-Fat Diet in APP23 Mice. (2010). doi:10.1523/JNEUROSCI.1051-10.2010
168. Carter, A. Y. *et al.* Liver X receptor agonist treatment significantly affects phenotype and transcriptome of APOE3 and APOE4 Abca1 haplo-deficient mice. *PLoS One* **12**, e0172161 (2017).
169. Hindinger, C. *et al.* Liver X receptor activation decreases the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neurosci. Res.* **84**, 1225–1234 (2006).
170. Xu, J., Wagoner, G., Douglas, J. C. & Drew, P. D. Liver X receptor agonist regulation of Th17 lymphocyte function in autoimmunity. *J. Leukoc. Biol.* **86**, 401 (2009).
171. Brunham, L. R. *et al.* Tissue-specific induction of intestinal ABCA1 expression with a liver X receptor agonist raises plasma HDL cholesterol levels. *Circ. Res.* **99**, 672–674 (2006).
172. Dai, Y.-B., Tan, X.-J., Wu, W.-F., Warner, M. & Gustafsson, J.-Å. Liver X receptor β protects dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson disease. doi:10.1073/pnas.1210833109
173. Mitro, N. *et al.* LXR and TSPO as new therapeutic targets to increase the levels of neuroactive steroids in the central nervous system of diabetic animals. *Neurochem. Int.* **60**, 616–621 (2012).
174. Stukas, S. *et al.* The LXR agonist GW3965 increases apoA-I protein levels in the central nervous system independent of ABCA1. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1821**, 536–546 (2012).
175. Namjoshi, D. R. *et al.* The Liver X Receptor Agonist GW3965 Improves Recovery from Mild Repetitive Traumatic Brain Injury in Mice Partly through Apolipoprotein E. *PLoS One* **8**, e53529 (2013).
176. Sandoval-Hernández, A. G., Restrepo, A., Cardona-Gómez, G. P. & Arboleda, G. LXR activation protects hippocampal microvasculature in very old triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* **621**, 15–21 (2016).
177. Li, J. *et al.* The liver X receptors agonist GW3965 attenuates depressive-like behaviors and suppresses microglial activation and neuroinflammation in hippocampal subregions in a mouse depression model. *J. Comp. Neurol.* **530**, 2852–2867 (2022).

178. Willaime, S. *et al.* Ceramide-induced apoptosis in cortical neurons is mediated by an increase in p38 phosphorylation and not by the decrease in ERK phosphorylation. *Eur. J. Neurosci.* **13**, 2037–2046 (2001).
179. Pelled, D. *et al.* Death-associated protein (DAP) kinase plays a central role in ceramide-induced apoptosis in cultured hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* **277**, 1957–1961 (2002).
180. Lee, H. *et al.* Multi-omic analysis of selectively vulnerable motor neuron subtypes implicates altered lipid metabolism in ALS. *Nat. Neurosci.* **24**, 1673–1685 (2021).
181. Sarbu, M., Ica, R. & Zamfir, A. D. Gangliosides as Biomarkers of Human Brain Diseases: Trends in Discovery and Characterization by High-Performance Mass Spectrometry. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, (2022).
182. Leal, A. F. *et al.* Gm2 gangliosidosis: Clinical features, pathophysiological aspects, and current therapies. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1–27 (2020).
183. Breiden, B. & Sandhoff, K. Lysosomal glycosphingolipid storage diseases. *Annu. Rev. Biochem.* **88**, 461–485 (2019).
184. Trostchansky, A. *et al.* Profile of arachidonic acid-derived inflammatory markers and its modulation by nitro-oleic acid in an inherited model of amyotrophic lateral sclerosis. *Front. Mol. Neurosci.* **11**, (2018).
185. Iizecka, J. Prostaglandin E2 is increased in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Acta Neurol. Scand.* **108**, 125–129 (2003).
186. Delaye, J. B. *et al.* Low IDL-B and high LDL-1 subfraction levels in serum of ALS patients. *J. Neurol. Sci.* **380**, 124–127 (2017).
187. Sutedja, N. A. *et al.* Beneficial vascular risk profile is associated with amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **82**, 638–642 (2011).
188. Yang, J. W. *et al.* Hypolipidemia in patients with amyotrophic lateral sclerosis: A possible gender difference? *J. Clin. Neurol.* **9**, 125–129 (2013).
189. Mariosa, D. *et al.* Blood biomarkers of carbohydrate, lipid, and apolipoprotein metabolisms and risk of amyotrophic lateral sclerosis: A more than 20-year follow-up of the Swedish AMORIS cohort. *Ann. Neurol.* **81**, 718–728 (2017).
190. Bandres-Ciga, S. *et al.* Shared polygenic risk and causal inferences in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* **85**, 470–481 (2019).
191. Steyn, F. J. *et al.* Hypermetabolism in ALS is associated with greater functional decline and shorter survival Neurodegeneration. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **89**, 1016–1023 (2018).
192. Dietschy, J. M. & Turley, S. D. Cholesterol metabolism in the brain. *Curr. Opin. Lipidol.* **12**, 105–112 (2001).
193. Winkler, E. A. *et al.* Blood-spinal cord barrier breakdown and pericyte reductions in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol.* **125**, 111–120 (2013).
194. Garbuzova-Davis, S. *et al.* Impaired blood–brain/spinal cord barrier in ALS patients. *Brain Res.* **1469**, 114–128 (2012).
195. Meaney, S., Lütjohann, D., Diczfalusy, U. & Björkhem, I. Formation of oxysterols from different pools of cholesterol as studied by stable isotope technique: Cerebral origin of most circulating 24S-hydroxycholesterol in rats, but not in mice. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1486**, 293–298 (2000).
196. Lund, E. G., Guileyardo, J. M. & Russell, D. W. cDNA cloning of cholesterol 24-hydroxylase, a mediator of cholesterol homeostasis in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 7238–7243 (1999).

197. Wuolikainen, A. *et al.* Cholesterol, oxysterol, triglyceride, and coenzyme q homeostasis in als. evidence against the hypothesis that elevated 27-hydroxycholesterol is a pathogenic factor. *PLoS One* **9**, (2014).
198. Diekstra, F. P. *et al.* Mapping of gene expression reveals CYP27A1 as a susceptibility gene for sporadic ALS. *PLoS One* **7**, (2012).
199. Schumacher, J. *et al.* Statins, diabetes mellitus and prognosis of amyotrophic lateral sclerosis: data from 501 patients of a population-based registry in southwest Germany. *Eur. J. Neurol.* **27**, 1405–1414 (2020).
200. Drory, V. E., Bronipolsky, T., Artamonov, I. & Nefussy, B. Influence of statins treatment on survival in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* **273**, 81–83 (2008).
201. Nabizadeh, F. *et al.* Statins and risk of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Acta Neurol. Belg.* **122**, 979–986 (2022).
202. Skerrett, R., Malm, T. & Landreth, G. Nuclear receptors in neurodegenerative diseases. *Neurobiol. Dis.* **72**, 104–116 (2014).
203. Zelcer, N. *et al.* Attenuation of neuroinflammation and Alzheimer's disease pathology by liver x receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 10601–10606 (2007).
204. Koldamova, R., Fitz, N. F. & Lefterov, I. The role of ATP-binding cassette transporter A1 in Alzheimer's disease and neurodegeneration. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1801**, 824–830 (2010).
205. Terwel, D. *et al.* Critical role of astroglial apolipoprotein E and liver X receptor- α expression for microglial A β phagocytosis. *J. Neurosci.* **31**, 7049–7059 (2011).
206. Cui, G. *et al.* Liver X receptor (LXR) mediates negative regulation of mouse and human Th17 differentiation. *J. Clin. Invest.* **121**, 658 (2011).
207. Sandoval-Hernández, A. G., Buitrago, L., Moreno, H., Cardona-Gómez, G. P. & Arboleda, G. Role of Liver X receptor in AD pathophysiology. *PLoS One* **10**, (2015).
208. Cui, W. *et al.* Liver X receptor activation attenuates inflammatory response and protects cholinergic neurons in APP/PS1 transgenic mice. *Neuroscience* **210**, 200–210 (2012).
209. Wang, L. *et al.* Liver X receptors in the central nervous system: From lipid homeostasis to neuronal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 13878–13883 (2002).
210. Dai, Y. B., Tan, X. J., Wu, W. F., Warner, M. & Gustafsson, J. Å. Liver X receptor β protects dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 13112–13117 (2012).
211. Trousson, A. *et al.* 25-hydroxycholesterol provokes oligodendrocyte cell line apoptosis and stimulates the secreted phospholipase A2 type IIA via LXR beta and PXR. *J. Neurochem.* **109**, 945–958 (2009).
212. Makoukji, J. *et al.* Interplay between LXR and Wnt/ β -catenin signaling in the negative regulation of peripheral myelin genes by oxysterols. *J. Neurosci.* **31**, 9620–9629 (2011).
213. Andersson, S., Gustafsson, N., Warner, M. & Gustafsson, J. Å. Inactivation of liver X receptor β leads to adult-onset motor neuron degeneration in male mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 3857–3862 (2005).
214. Sun, S. *et al.* Translational profiling identifies a cascade of damage initiated in motor neurons and spreading to glia in mutant sod1-mediated ALS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, E6993–E7002 (2015).
215. Xu, Z., Lee, A., Nouwens, A., Henderson, R. D. & McCombe, P. A. Mass spectrometry analysis of plasma from amyotrophic lateral sclerosis and control subjects. *Amyotroph. Lateral Scler. Front. Degener.* **19**, 362–376 (2018).

216. Mouzat, K. *et al.* Liver X Receptor Genes Variants Modulate ALS Phenotype. *Mol. Neurobiol.* **55**, 1959–1965 (2018).
217. Zhao, Z., Sui, Y., Gao, W., Cai, B. & Fan, D. Effects of diet on adenosine monophosphate-activated protein kinase activity and disease progression in an amyotrophic lateral sclerosis model. *J. Int. Med. Res.* **43**, 67–79 (2015).
218. Hogg, M. C., Halang, L., Woods, I., Coughlan, K. S. & Prehn, J. H. M. Riluzole does not improve lifespan or motor function in three ALS mouse models. *Amyotroph. Lateral Scler. Front. Degener.* **19**, 438–445 (2018).
219. Li, J., Sung, M. & Rutkove, S. B. Electrophysiologic Biomarkers for Assessing Disease Progression and the Effect of Riluzole in SOD1 G93A ALS Mice. *PLoS One* **8**, (2013).
220. Ralph, G. S. *et al.* Silencing mutant SOD1 using RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALS model. *Nat. Med.* **11**, 429–433 (2005).
221. McCampbell, A. *et al.* Antisense oligonucleotides extend survival and reverse decrement in muscle response in ALS models. *J. Clin. Invest.* **128**, 3558 (2018).
222. Zhao, W. *et al.* Caprylic Triglyceride as a Novel Therapeutic Approach to Effectively Improve the Performance and Attenuate the Symptoms Due to the Motor Neuron Loss in ALS Disease. doi:10.1371/journal.pone.0049191
223. Oliván, S. *et al.* Extra virgin olive oil intake delays the development of amyotrophic lateral sclerosis associated with reduced reticulum stress and autophagy in muscle of SOD1G93A mice. *J. Nutr. Biochem.* **25**, 885–892 (2014).
224. Potenza, R. L. *et al.* Fingolimod: A Disease-Modifier Drug in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotherapeutics* **13**, 918–927 (2016).
225. Xu, X. *et al.* A natural human IgM that binds to gangliosides is therapeutic in murine models of amyotrophic lateral sclerosis. *DMM Dis. Model. Mech.* **8**, 831–842 (2015).
226. EDARAVONE AND BORNEOL FOR TREATING AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS - Patent 3308783. Available at: https://data.epo.org/publication-server/rest/v1.2/patents/EP3308783NWB1/document.html?utm_source=chatgpt.com. (Accessed: 14th July 2025)
227. Meffre, D. *et al.* Liver X receptors alpha and beta promote myelination and remyelination in the cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 7587–7592 (2015).
228. Traiffort, E., Morisset-Lopez, S., Moussaed, M. & Zahaf, A. Defective oligodendroglial lineage and demyelination in amyotrophic lateral sclerosis. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, (2021).
229. Joseph, S. B., Castrillo, A., Laffitte, B. A., Mangelsdorf, D. J. & Tontonoz, P. Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat. Med.* **9**, 213–219 (2003).
230. Pascual-García, M. *et al.* Reciprocal Negative Cross-Talk between Liver X Receptors (LXRs) and STAT1: Effects on IFN- γ -Induced Inflammatory Responses and LXR-Dependent Gene Expression. *J. Immunol.* **190**, 6520–6532 (2013).
231. Fowler, A. J. *et al.* Liver X receptor activators display anti-inflammatory activity in irritant and allergic contact dermatitis models: Liver-X-receptor-specific inhibition of inflammation and primary cytokine production. *J. Invest. Dermatol.* **120**, 246–255 (2003).
232. Han, S. *et al.* Liver X receptor agonist therapy prevents diffuse alveolar hemorrhage in murine lupus by repolarizing macrophages. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
233. Park, M. C., Kwon, Y. J., Chung, S. J., Park, Y. B. & Lee, S. K. Liver X receptor agonist prevents the evolution of collagen-induced arthritis in mice. *Rheumatology (Oxford)*. **49**, 882–890 (2010).
234. Li, P. *et al.* XNCoR repression of LXRs restricts macrophage biosynthesis of insulin-

- sensitizing omega 3 fatty acids. *Cell* **155**, (2013).
235. Schultz, J. R. *et al.* Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev.* **14**, 2831–2838 (2000).
 236. Cha, J. Y. & Repa, J. J. The Liver X Receptor (LXR) and hepatic lipogenesis: The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR. *J. Biol. Chem.* **282**, 743–751 (2007).
 237. Egawa, N. *et al.* TDP-43 regulates cholesterol biosynthesis by inhibiting sterol regulatory element-binding protein 2. *Sci. Rep.* **12**, 1–12 (2022).
 238. Ho, W. Y. *et al.* Tdp-43 mediates srebf2-regulated gene expression required for oligodendrocyte myelination. *J. Cell Biol.* **220**, (2021).
 239. Guzman, K. M. *et al.* Conditional depletion of Fus in oligodendrocytes leads to motor hyperactivity and increased myelin deposition associated with Akt and cholesterol activation. *Glia* **68**, 2040 (2020).
 240. Rezaei, A. *et al.* Correction of dysregulated lipid metabolism normalizes gene expression in oligodendrocytes and prolongs lifespan in female poly-GA C9orf72 mice. *Nat. Commun.* **2025 161 16**, 1–17 (2025).

