

Miriam de la Torre Sebastián

Mecanismo de acción del fármaco
5-Fluorouracilo y su efectividad
como tratamiento en un modelo
murino de Esclerosis Lateral
Amiotrófica.

Director/es

Toivonen, Janne Markus
Osta Pinzolas, Rosario

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

MECANISMO DE ACCIÓN DEL FÁRMACO 5-
FLUOROURACILO Y SU EFECTIVIDAD COMO
TRATAMIENTO EN UN MODELO MURINO DE
ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA.

Autor

Miriam de la Torre Sebastián

Director/es

Toivonen, Janne Markus
Osta Pinzolas, Rosario

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

2021

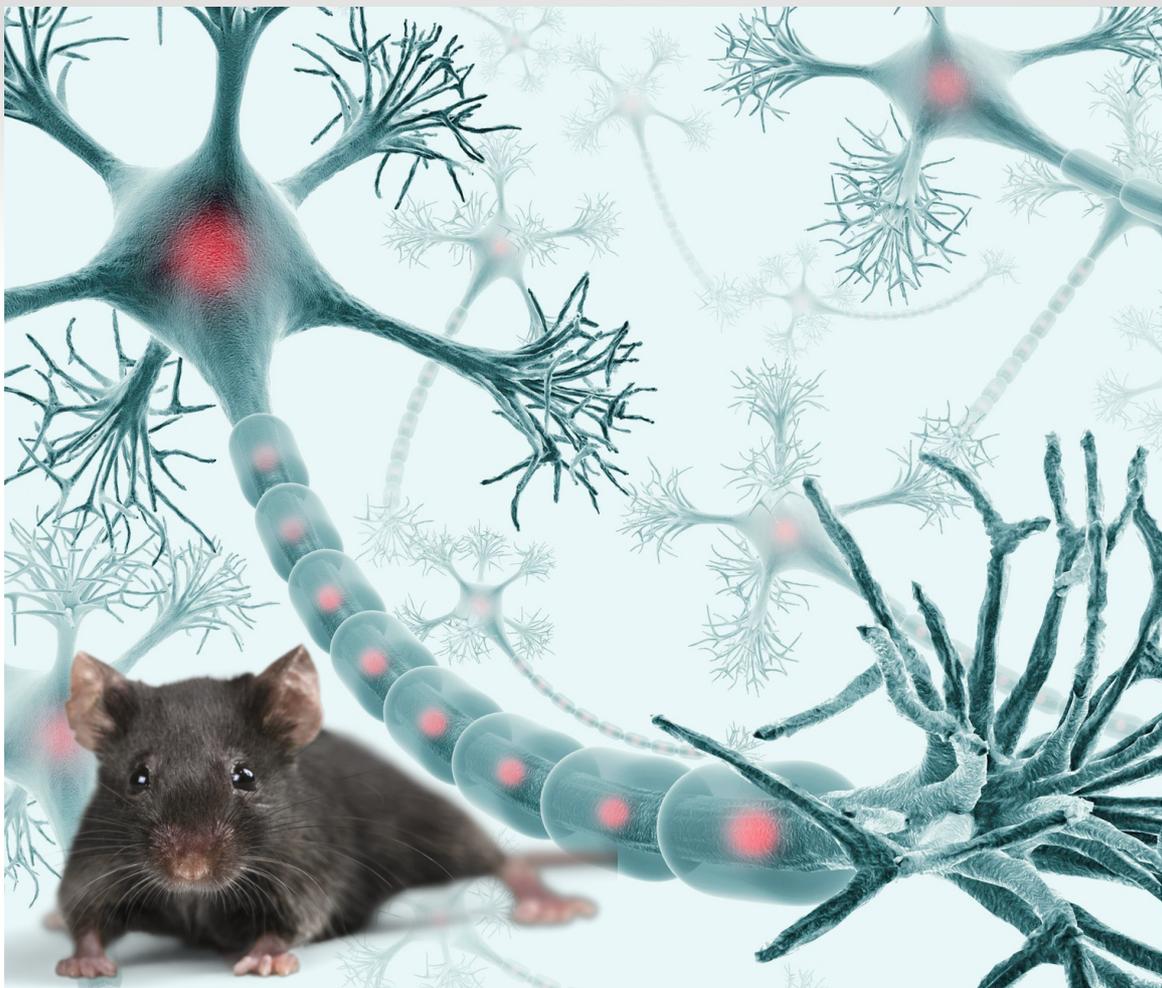


Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Universidad
Zaragoza

Mecanismo de acción del fármaco 5-fluorouracilo y su efectividad como tratamiento en un modelo murino de Esclerosis Lateral Amiotrófica



Tesis Doctoral
Miriam de la Torre Sebastián
2020



**Universidad
Zaragoza**

Laboratorio de Genética Bioquímica (LAGENBIO)

Departamento de Anatomía, Embriología y Genética Animal

Facultad de Veterinaria

Universidad de Zaragoza

**MECANISMO DE ACCIÓN DEL FÁRMACO 5-FLUOROURACILO Y SU
EFECTIVIDAD COMO TRATAMIENTO EN UN MODELO MURINO DE
ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA.**

Memoria presentada por:

Miriam de la Torre Sebastián

Para optar al grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza

Zaragoza, diciembre 2020



**Departamento de
Anatomía, Embriología
y Genética Animal**
Universidad Zaragoza

Doña **Rosario Osta Pinzolas**, Profesora Catedrática de Universidad, y Don Janne Markus Toivonen, Contratado Doctor Investigador, del Departamento de Anatomía, Embriología y Genética Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza.

CERTIFICAN QUE:

La Tesis doctoral titulada “Mecanismo de acción del fármaco 5-Fluorouracilo y su efectividad en un modelo murino de Esclerosis Lateral Amiotrófica” que se recoge en la presente Memoria, de la que es autora Miriam de la Torre Sebastián, ha sido realizada bajo nuestra dirección y se corresponde con el Proyecto de Tesis aprobado por la Comisión Académica de Doctorado en marzo de 2016, cumpliendo, por tanto, todos los requisitos exigidos para que su autora pueda optar al Grado de Doctora por la Universidad de Zaragoza.

Y para que así conste, firman la presente en Zaragoza a 22 de diciembre de 2020.

Fdo. Rosario Osta Pinzolas

Fdo. Janne Markus Toivonen

Este trabajo ha sido financiado a través de los siguientes organismos y proyectos:

- Proyecto: “A “mojarse” por la ELA: Buscando su tratamiento”. Fondos obtenidos a través de la plataforma de crowdfunding PRECIPITA.
- Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED-612).
- Grupo consolidado A17 LAGENBIO del Gobierno de Aragón.



A Julia, Anne y Fernando

*“Si amas la vida no pierdas tiempo,
de tiempo está hecha la vida”*

Bruce Lee

AGRADECIMIENTOS

Cada vez que he pensado en el momento de escribir los agradecimientos daba por hecho que sería fácil y rápido, pero no ha sido así; la mezcla de sentimientos es tan grande que resulta complicado elegir las palabras para expresar mi agradecimiento a tantas personas que durante estos años han contribuido de una manera u otra, a que este trabajo salga adelante. Seguramente me dejaré a alguien así que, MUCHAS GRACIAS A TODOS.

Gracias a. mis directores, Charo y Janne, por haberme guiado en este arduo pero satisfactorio camino. Charo, gracias por haberme dado la oportunidad de poder descubrir lo complicada, bonita y apasionante que es la investigación; gracias por tus consejos y tu paciencia. Janne, gracias por tus consejos, ayudarme en todo lo que he necesitado y por tus ánimos siempre, sobre todo en los últimos meses.

Gracias a Don Isaías Zarazaga y Pilar Zaragoza por permitirme formar parte de este magnífico grupo.

Gracias Clemen, Inma y Ana Cris por vuestra ayuda y consejos. Ana Solana, gracias por tu sonrisa permanente y por estar dispuesta a ayudar en lo que haga falta. Arianne, gracias por los consejos, las risas y las miles de conversaciones. Carmen, gracias por escucharme, por las conversaciones y por tus consejos. Gracias a Adelaida, Tresa y Leticia por traer “aire fresco” al laboratorio, por las risas y la disposición a ayudar. Raquel, gracias por las conversaciones y tus consejos. Laura Moreno, gracias por ayudarme en todo lo que he necesitado y por contestarme siempre con una sonrisa a los millones de preguntas que te he hecho estos años. Gracias a Javier Miana por ayudarme en el animalario. Gracias a Laura y Alina por soportar mi locura, por las risas, por escucharme, por los ánimos y por ayudarme en todo lo que necesitara. Alina, gracias por tu energía y optimismo. Laura, gracias por adoptar a Punky y por escucharme y apoyarme estos años. También quiero acordarme y dar las gracias a las personas que han pasado por el laboratorio; Sara, Amaya, Samanta, Diego, Bea, David, gracias por los buenos momentos compartidos y porque de todos he aprendido algo.

Gracias al personal del animalario del CIBA, Pilar, Silvia, Elena, Eduardo, Josemi, Chus, Susi, Jose Luis, Jose, Cristian, Jose Antonio, por vuestra profesionalidad, simpatía, predisposición a facilitar el trabajo y por cuidar siempre tan bien a “mis fieras”. Gracias al grupo de Toxicología de la

Facultad de Veterinaria, por recibirme siempre con una sonrisa. Gracias a Eva Galvez y su equipo por su colaboración.

Quería dar un GRACIAS especial a todas las personas, tanto anónimas como no anónimas (ver anexo I) que colaboraron con el crowdfunding PRECIPITA para que este proyecto pudiera realizarse. Gracias en especial por su colaboración a: Asociación Adelante La Roda, Asociación de Enfermedades Neuromusculares de Castilla la Mancha, Asociación de Veteranos de Porcino de Aragón AVPA, Asociación Juntos Venceremos ELA y Asociación Redela Investigación. También gracias al equipo de Precipita, por su trabajo y por ayudar a dar visibilidad a la ELA.

Gracias a David Flores por hacerme ver la diversidad que hay en el mundo y por ayudarme a encontrar la energía necesaria en mi vida. Gracias a Gemma y Pilar por el interés y los ánimos. Gracias a “Los ramperos” por los ánimos, las quedadas improvisadas, las risas, las conversaciones, por haber podido descubrir a gente fantástica.

Gracias a Ana y Carlos por los millones de momentos vividos, por el apoyo y por una amistad de tantos años. Ana, gracias por estar siempre. Gracias a Marta G, porque a pesar de la distancia, la amistad de tantos años se mantiene intacta. Gracias a Elena y Edu por las risas y las quedadas improvisadas.

Gracias a mis sobrinos Irune, Noa, Jorge, Jaime, Abril y Nahara por enseñarme a ver el mundo desde otra perspectiva y por tantos buenos momentos vividos. Gracias a Blanqui y Guillermo por el interés mostrado. Gracias a Itziar, David, Miguel y Susana por los buenos momentos vividos, el interés y apoyo. Itziar, gracias por los ánimos y por estar ahí. Gracias a Carmen, Fernando, María, Víctor, Javi y Rut por los buenos momentos vividos. Carmen y Fernando, gracias por vuestro apoyo, vuestro ánimo y por estar siempre “al pie del cañón”.

Gracias a mis padres, Miguel y Carmen, por apoyarme siempre. Papá, gracias por tus consejos, apoyo y estar siempre al “pie del cañón”. Mamá, se que siempre estás ahí, a mi lado.

Gracias a Fernando, mi compañero de vida. GRACIAS por tu infinita paciencia, por creer en mí, apoyarme siempre, animarme, aconsejarme, gracias por ser tú. Gracias a mis bomboncitos, Anne y Julia. GRACIAS por hacerme valorar y ver lo importante de la vida; gracias porque con solo una sonrisa vuestra se olvida todo. Recordad, hasta el infinito y más allá.

¡MUCHAS GRACIAS A TODOS!

INDICE

Índice

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 1 |
| INTRODUCCIÓN | 7 |
| 2.1. Esclerosis Lateral Amiotrófica..... | 7 |
| 2.1.1. Definición y aspectos generales..... | 7 |
| 2.1.2. Etiología..... | 8 |
| 2.1.3. Epidemiología | 13 |
| 2.1.4. Sintomatología..... | 14 |
| 2.1.5. Diagnóstico | 15 |
| 2.1.6. Patogenia..... | 16 |
| 2.1.6.1. Excitotoxicidad mediada por glutamato | 19 |
| 2.1.6.2. Alteración del transporte axonal | 20 |
| 2.1.6.3. Desregulación del tráfico endosomal | 21 |
| 2.1.6.4. Disfunción mitocondrial | 21 |
| 2.1.6.5. Desregulación de la homeostasis proteica..... | 23 |
| 2.1.6.6. Alteración del metabolismo de RNA..... | 26 |
| 2.1.6.7. Reparación del DNA | 27 |
| 2.1.6.8. Estrés oxidativo..... | 27 |
| 2.1.6.9. Neuroinflamación | 29 |
| 2.1.6.10. El Inflamasoma NLRP3 en la ELA..... | 33 |
| 2.1.6.11. MicroRNAs en la ELA..... | 34 |
| 2.2. Modelos experimentales en ELA | 36 |
| 2.2.1. Modelos celulares | 38 |
| 2.2.1.1.- <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 38 |
| 2.2.1.2.- Modelos celulares de ratón | 39 |
| 2.2.1.3. Células Madre Pluripotenciales Inducidas | 39 |
| 2.2.2.-Modelos animales | 40 |
| 2.2.2.1.- <i>Caenorhabditis elegans</i> | 40 |
| 2.2.2.2.- <i>Drosophila melanogaster</i> | 41 |
| 2.2.2.3.- <i>Danio rerio</i> | 42 |
| 2.2.2.4. Modelos roedores..... | 42 |
| 2.2.2.4.1. <i>Mus Musculus</i> | 43 |
| 2.2.2.4.1.1. Modelos SOD1 | 43 |

| | |
|--|-----------|
| 2.2.2.4.1.2. Modelos TDP-43..... | 46 |
| 2.2.2.4.1.3. Modelos FUS..... | 47 |
| 2.2.2.4.1.4. Modelos C9ORF72..... | 48 |
| 2.2.2.4.2. <i>Rattus Norvegicus</i> | 48 |
| 2.2.2.5. Otros animales..... | 49 |
| 2.3. Aproximaciones terapéuticas en la ELA..... | 50 |
| 2.3.1. Tratamientos experimentales en la ELA..... | 51 |
| 2.3.1.1. Terapia antiexcitotoxicidad..... | 51 |
| 2.3.1.2. Terapias antioxidantes y/o estrés oxidativo..... | 53 |
| 2.3.1.3. Modulación de la función mitocondrial y apoptosis..... | 55 |
| 2.3.1.4. Terapia antiagregados y modulación de la autofagia..... | 57 |
| 2.3.1.5. Factores neurotróficos..... | 59 |
| 2.3.1.6. Terapias anti-neuroinflamación..... | 61 |
| 2.3.1.7. Protección de la unión neuromuscular y músculo esquelético..... | 63 |
| 2.3.1.8 Terapia inhibidores de la división celular..... | 65 |
| 2.4. 5-FLUOROURACILO..... | 66 |
| 2.4.1. Definición y mecanismos de acción..... | 66 |
| 2.4.2. Efecto a nivel de ácidos nucleicos..... | 67 |
| 2.4.3. Efectos en médula ósea y Sistema Nervioso Central..... | 69 |
| 2.4.4 5-Fluorouracilo y su potencial uso en ELA..... | 70 |
| 2.4.5. Análogos del 5-Fluorouracilo..... | 71 |
| OBJETIVOS..... | 73 |
| MATERIAL Y MÉTODOS..... | 77 |
| 4.1. MODELO MURINO SOD1G93A..... | 77 |
| 4.1.1. Aspectos generales..... | 77 |
| 4.1.2. Genotipado..... | 78 |
| 4.2. OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS..... | 79 |
| 4.2.1. Extracción de tejidos..... | 79 |
| 4.2.2. Extracción de suero a partir de sangre cardiaca..... | 79 |
| 4.3. ADMINISTRACIÓN DE 5-FLUOROURACILO (5-FU)..... | 80 |
| 4.4. PRUEBAS FUNCIONALES..... | 80 |
| 4.4.1. Peso..... | 81 |
| 4.4.2. Test de rotarod..... | 81 |
| 4.4.3. Test de campo abierto (open field)..... | 82 |

| | |
|--|------------|
| 4.4.4. Supervivencia..... | 82 |
| 4.5. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA | 82 |
| 4.5.1. Extracción de RNA..... | 82 |
| 4.5.2. Retrotranscripción (RT) | 83 |
| 4.5.3. PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)..... | 83 |
| 4.6. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE MICRORNA (miRNA) | 85 |
| 4.6.1. miRNA retrotranscripción (RT) | 85 |
| 4.6.2. PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) para miRNA..... | 85 |
| 4.7 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN PROTEICA | 86 |
| 4.7.1. Extracción y cuantificación proteica | 86 |
| 4.7.2. Electroforesis e inmunodetección | 87 |
| 4.8. ENSAYOS DE 5-FLUOROURACILO Y CAPECITABINA..... | 90 |
| 4.8.1 Estudio de distintas dosis de 5-Fluorouracilo | 90 |
| 4.8.2. Ensayo farmacocinético de Capecitabina y 5-Fluorouracilo..... | 90 |
| 4.8.3. Ensayo de toxicidad de Capecitabina..... | 91 |
| 4.8.4. Ensayo de detección de 5-FU en tejidos | 91 |
| 4.9. ANÁLISIS DE DATOS Y ESTADÍSTICO | 92 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 93 |
| CAPÍTULO 1 | 95 |
| CAPÍTULO 2 | 107 |
| CAPÍTULO 3 | 121 |
| CAPÍTULO 4 | 127 |
| CAPÍTULO 5 | 139 |
| CONCLUSIONES..... | 155 |
| BIBLIOGRAFÍA | 159 |
| ABREVIATURAS..... | 193 |
| ANEXO I | 199 |

RESUMEN 1

RESUMEN

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa que se caracteriza por una afectación selectiva y pérdida progresiva de las motoneuronas que inervan los músculos estriados. La pérdida de motoneuronas conlleva una parálisis, debilidad y atrofia muscular que desencadena la muerte del paciente en un promedio de 3 a 5 tras el inicio de los síntomas. La etiología de la ELA no está clara y se han sugerido numerosos mecanismos moleculares implicados en la patogenia, entre ellos la neuroinflamación. Algunos de los mediadores de este proceso neuroinflamatorio son unos complejos proteicos citosólicos conocidos como inflamomas, siendo el inflamoma NLRP3 el mejor caracterizado. Otros mediadores que podrían tener un papel fundamental son los microRNAs (miRNAs) ya que son reguladores de multitud de procesos fisiológicos. Actualmente no existe un tratamiento curativo o que ralentice de forma efectiva la progresión de la enfermedad, por tanto, la búsqueda de tratamientos constituye uno de los objetivos primordiales de la investigación de esta enfermedad. El reposicionamiento de fármacos, uso de un medicamento ya autorizado para tratar una patología que puede ser potencialmente eficaz para tratar otras enfermedades, es una buena estrategia para enfermedades tan devastadoras y rápidas como la ELA. Estudios previos de nuestro laboratorio con el quimioterápico 5-Fluorouracilo (5-FU) mostraron unos resultados prometedores en el modelo animal SOD1G93A ya que retrasó la aparición de la enfermedad, mejoró el comportamiento motor y prolongó la supervivencia de los animales. Sin embargo, el mecanismo de acción del 5-FU en la ELA es desconocido.

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral fue conocer en profundidad las posibilidades del 5-FU como tratamiento y conocer el mecanismo de acción por el que este efecto tenía lugar, utilizando para este fin el modelo animal de Esclerosis Lateral Amiotrófica SOD1G93A. Respecto al mecanismo de acción, en primer lugar, se estudió el inflamoma NLRP3 en cuádriceps y médula espinal de ratones SOD1G93A a lo largo de la enfermedad y el efecto del fármaco en ellos. Los resultados mostraron un posible efecto del 5-FU sobre el inflamoma en la etapa final. Posteriormente, se investigó la expresión de diferentes miRNAs implicados en el proceso inflamatorio en cuádriceps y médula espinal del modelo animal a lo largo de la enfermedad. Sin embargo, no se observó un claro efecto del 5-FU sobre la expresión de los miRNAs.

Por otro lado, también se estudió la toxicidad y eficacia en el ratón SOD1G93A de Capecitabina, profármaco del 5-FU, ya que presenta una eficacia similar y efectos secundarios más leves. Aunque los resultados no mostraron efectos adversos, no se continuó investigando su eficacia debido al problema que podría suponer su administración en los enfermos terminales. Asimismo, se estudió la biodisponibilidad del 5-FU demostrando que es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica.

Con el fin de evitar en el mayor grado posible los efectos secundarios que produce el 5-FU, se estudió la posibilidad de encontrar una dosis menor que muestre la misma efectividad que la original, así como una mayor dosis que incrementará los efectos beneficiosos. Para ello, se realizó un estudio piloto de efectividad con distintas dosis. Los resultados indicaron que una dosis menor que la original podría resultar más efectiva. En consecuencia, realizamos un ensayo preclínico completo para estudiar en profundidad la efectividad de la nueva dosis y sorprendentemente, los resultados mostraron que la nueva dosis estudiada no era efectiva en el modelo animal. Por ello, nos planteamos la posibilidad de que hubiera algo en el ambiente que pudiera estar modificando la respuesta al fármaco, ya que los animales provenían de un ambiente distinto al del estudio original. Para comprobar dicha teoría, se realizó un estudio de supervivencia con grupos de animales que provenían de diferentes ambientes. Los resultados mostraron diferencias en cuanto a la efectividad del 5-FU en las distintas condiciones experimentales.

En conclusión, el inflammasoma NLP3 parece estar modulado de forma leve por la acción del 5-FU en el modelo SOD1G93A, no observando los mismos resultados en la expresión de los miRNAs relacionados con la enfermedad. Por otra parte, el fármaco muestra un efecto beneficioso en el modelo animal SOD1G93A en unas condiciones ambientales concretas. Las condiciones ambientales parecen tener mucha influencia en el animal SOD1G93A y en la respuesta al 5-FU. Estos resultados indican que es necesario comprobar distintas condiciones ambientales antes de proponer una posible terapia efectiva para los pacientes de ELA con la utilización de los modelos animales de ELA SOD1G93A.

SUMMARY

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease characterized by a selective and progressive loss of the motor neurons that connect to skeletal muscles. The loss of motor neurons leads to paralysis, weakness and muscular atrophy triggering death of the patient in a period of 3 to 5 years on average after the onset of symptoms. The etiology of ALS is unclear and numerous molecular mechanisms, including neuroinflammation, have been suggested to be involved in the pathogenesis. Some of the mediators of this neuroinflammatory process are cytosolic protein complexes known as inflammasomes, of which the best characterized is the NLRP3 inflammasome. Other mediators that could play a fundamental role are microRNAs (miRNAs) that regulate numerous physiological processes. Currently, there is no curative treatment or one that could efficiently slow down the progression of the disease. Therefore, searching a treatment for ALS is one of the primary goals of the research field. Drug repositioning, the use of drugs previously approved to treat other pathologies, is a promising strategy for such devastating and rapid disease as ALS. In our laboratory, previous studies with a chemotherapeutic agent 5-fluorouracil (5-FU) have shown promising results in the SOD1G93A mouse model of ALS as it delayed the onset symptoms, improved motor behavior and prolonged the lifespan of the animals. However, the mechanism of action underlying the beneficial effect of 5-FU in this model is unknown.

The main objective of this doctoral thesis was to investigate in depth the possibilities of 5-FU as a treatment for ALS and to elucidate the molecular mechanisms behind the 5-FU action using SOD1G93A model. First, the NLRP3 inflammasome was studied in quadriceps and in spinal cord of SOD1G93A mice throughout the disease and the effect 5-FU administration on its levels was addressed. The results indicated a possible effect of 5-FU on the inflammasome in the final stage. Subsequently, the expression levels of several miRNAs involved in the inflammatory process were investigated in the quadriceps and spinal cord throughout the disease. However, there was no clear effect of 5-FU on the expression of miRNAs.

On the other hand, the toxicity and efficacy of Capecitabine, a prodrug of 5-FU, was also studied in the SOD1G93A model, because this drug shows similar efficacy and milder side effects. Although the results did not show adverse effects, Capecitabine was not further investigated due to the potential problem related to its oral administration in terminally

patients. The bioavailability studies of 5-FU indicated that it may penetrate the blood-brain barrier.

To mitigate as much as possible the side effects produced by 5-FU, the possibility of reaching the same effectiveness with a lower dose was studied, as well as the potential of increasing the beneficial effects with higher dose. For this, a pilot study with different doses was carried out. The results suggested that a lower dose than the original could possibly be more effective. However, a complete preclinical trial indicated that the new dose was not effective. Because the experimental mice derived from different animal facilities than those in the original study, we considered the possibility that the environment to which the experimental animals are exposed could modify the response to the drug. To test this hypothesis, a survival study was carried out with groups of animals that came from different environments. The results indicated differences regarding the effectiveness of 5-FU in the different experimental conditions.

To conclude, the NLRP3 inflammasome seems to be modulated modestly by 5-FU in the SOD1G93A model whereas the expression of the immune and inflammation-related miRNAs is mostly unaltered by the drug. On the other hand, the 5-FU shows a beneficial effect in the SOD1G93A mice under specific environmental conditions that appear to have a great influence on the effectiveness of the drug. These results indicate that it is necessary to test different environmental conditions before proposing a putative effective therapy for ALS patients with the use of animal models of ALS such as SOD1G93A.

INTRODUCCIÓN 2

2.1. Esclerosis Lateral Amiotrófica

2.1.1. Definición y aspectos generales

Las enfermedades de motoneurona son trastornos neurodegenerativos progresivos con diferentes etiologías y espectros clínicos, pero con un desenlace común, la pérdida de motoneuronas superiores y/o inferiores. La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), la enfermedad de motoneurona más frecuente en el adulto; fue descrita en 1865 por el neurólogo francés Jean-Martin Charcot, quien correlacionó los síntomas clínicos con las lesiones anatómicas y diferenció esta enfermedad de otras patologías neurológicas. Charcot la denominó así al encontrar los haces corticoespinales laterales degenerados, duros y blanquecinos (esclerosis lateral) en pacientes con gran pérdida de masa muscular (amiotrófica).

La ELA está englobada dentro del grupo de enfermedades minoritarias debido a su baja prevalencia, afectando a menos de 5 personas cada 10000 individuos. Es una enfermedad neurodegenerativa devastadora que se caracteriza por una afectación selectiva y pérdida progresiva de las motoneuronas que inervan los músculos estriados (Figura 2.1). Esta degeneración se da tanto en las motoneuronas superiores (MNS) de la corteza motora y sus proyecciones corticobulbares y corticoespinales como en las motoneuronas inferiores (MNI) de tronco encefálico y médula espinal. La lesión y posterior muerte neuronal conlleva debilidad, atrofia muscular generalizada, espasticidad y fasciculaciones; viéndose seriamente comprometida la autonomía muscular, la deglución, la comunicación oral y la respiración, desencadenando en una parálisis del paciente y posterior muerte por fallo respiratorio, generalmente en un periodo de 2 a 5 años tras la aparición de los síntomas.

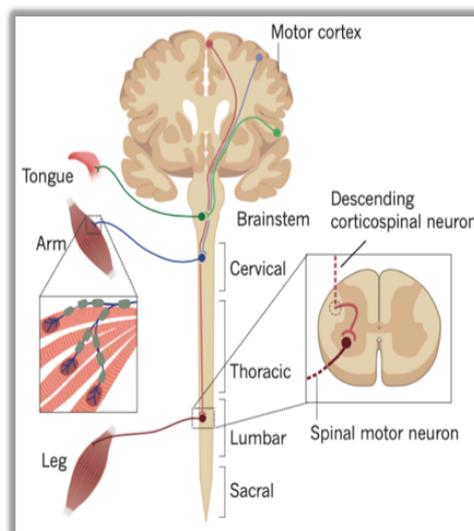


Figura 2.1. Componentes del sistema nervioso afectados por la ELA (Taylor et al., 2016).

A diferencia de otras enfermedades neurodegenerativas, la ELA no se caracterizaba tradicionalmente por una pérdida de las funciones cognitivas. Sin embargo, posteriormente se observó que podía existir una afectación de las neuronas del córtex frontal y prefrontal produciéndose una demencia frontotemporal (DFT), caracterizada por cambios de personalidad y comportamiento, déficit ejecutivo frontal y alteración en el manejo del lenguaje (Ingre et al.,

2015). Actualmente, se estima que hasta el 50% de los afectados de ELA muestran algún signo sutil de deterioro cognitivo y/o conductual y, hasta el 15% cumplen los criterios de DFT. Esta variante se la conoce como ELA con demencia frontotemporal (ELA-DFT) (Nguyen et al., 2018). Por tanto, se puede afirmar que la ELA y la DFT están relacionadas y se superponen clínica, patológica y genéticamente, considerándolas parte de un espectro continuo y no dos enfermedades separadas.

2.1.2. Etiología

Las causas exactas de la ELA a día de hoy siguen siendo desconocidas. Sin embargo, como sucede en otros trastornos, está asociado tanto a factores genéticos como no genéticos. La forma más común es la ELA esporádica (ELAE), representa un 90-95% de todos los casos y es de causa desconocida, sin un componente genético definido. Por el contrario, la ELA familiar (ELAF) representa un 10-15% de los casos, su origen es genético y se trata en la mayoría de los casos de una herencia autosómica dominante aunque ocasionalmente puede darse una herencia autosómica recesiva, a través de genes mitocondriales o ligados al cromosoma X (Al-Chalabi & Hardiman, 2013).

Los avances en secuenciación y biología molecular han facilitado que actualmente haya descritos tanto genes causales, como genes de susceptibilidad para desarrollar ELA (Tabla 2.1). Estos genes intervienen en diversos procesos biológicos como excitotoxicidad, procesamiento de proteínas, transporte intracelular, función mitocondrial y autofagia, evidenciando la implicación de diversos mecanismos en la patogenia de la enfermedad (Hardiman et al., 2017). Parte del descubrimiento de estos genes ha sido posible gracias a la realización, del Proyecto MinE, proyecto científico de investigación internacional cuyo objetivo es profundizar en la base genética de la ELA mediante un estudio de secuenciación del genoma completo a gran escala y que sigue desarrollándose actualmente. Para lograrlo, van a estudiarse al menos 15000 perfiles de ADN de pacientes con ELA y 7500 personas sanas como control para realizar un análisis comparativo entre estos 22500 perfiles de ADN (<https://www.projectmine.com>).

Tabla 2. 1. Principales genes implicados en ELA (Hardiman et al. 2017, Mathis et al. 2019)

| Tipo | Gen | Cromosoma | Herencia | Mecanismo implicado |
|-------------|------------|------------------|-----------------|-------------------------------------|
| ALS1 | SOD1 | 21q22 | AD/AR/DN | Estrés oxidativo |
| ALS2 | ALS2 | 2q33.1 | AR | Tráfico endosomal |
| ALS3 | - | 18q21 | AD | desconocido |
| ALS4 | SETX | 9q34.13 | AD | Metabolismo RNA |
| ALS5 | SPG11 | 15q15-21.1 | AR | Reparación DNA y crecimiento axonal |
| ALS6 | FUS | 16p11.2 | AD/AR | Metabolismo RNA |
| ALS7 | - | 20p13 | AD | desconocido |
| ALS8 | VAPB | 20q13.32 | AD | Estrés RE |
| ALS9 | ANG | 14q11.2 | AD | Metabolismo RNA |
| ALS10 | TARDBP | 1p36.22 | AD | Metabolismo RNA |
| ALS11 | FIG4 | 6q21 | AD | Tráfico endosomal |
| ALS12 | OPTN | 10p13 | AD/AR | Autofagia |
| ALS13 | ATXN2 | 12q24.12 | AD | Metabolismo RNA |
| ALS14 | VCP | 9p13.3 | AD | Autofagia |
| ALS15 | UBQLN2 | Xp11.21 | AD/LX | UPS y autofagia |
| ALS16 | SIGMAR1 | 9p13.3 | AR | UPS y autofagia |
| ALS17 | CHMP2B | 3p11.2 | AD | Tráfico Endosomal |
| ALS18 | PFN1 | 17p13.2 | AD | Citoesqueleto |
| ALS19 | ERBB4 | 2q34 | AD | Desarrollo neuronal |
| ALS20 | HNRNPA1 | 12q13.13 | AD | Metabolismo RNA |
| ALS21 | MATR3 | 5q31.2 | AD | Metabolismo RNA |
| ALS22 | TUBA4A | 2q35 | AD | Citoesqueleto y transporte axonal |
| ALS23 | ANXA11 | 10q22.3 | AD | Tráfico vesicular / Proteostasis |
| ALS-FTD1 | C9orf72 | 9p21.2 | AD | Metabolismo RNA y autofagia |
| ALS-FTD2 | CHCHD10 | 22q11.23 | AD | Mantenimiento mitocondrial |
| ALS-FTD3 | SQSTM1 | 5q35.3 | AD | Autofagia |
| ALS-FTD4 | TBK1 | 12q14.2 | AD | Autofagia/inflamación |

AD: autosómica dominante, AR: autosómica recesiva, DN: de novo, LX: ligada al sexo, UPS: sistema ubiquitin-proteasoma, RE: retículo endoplásmico

Los genes mutados más frecuentes en ELA son *C9orf72*, *SOD1*, *TARDBP* y *FUS* (Figura 2.2), aunque la frecuencia de las mutaciones depende en gran medida de los orígenes ancestrales (Mathis et al., 2019). Cabe resaltar que, aunque la mayoría de los casos de ELA esporádica son de causa desconocida, en algunos casos hay una base genética (Laferrère & PolymenidouPhD, 2015).

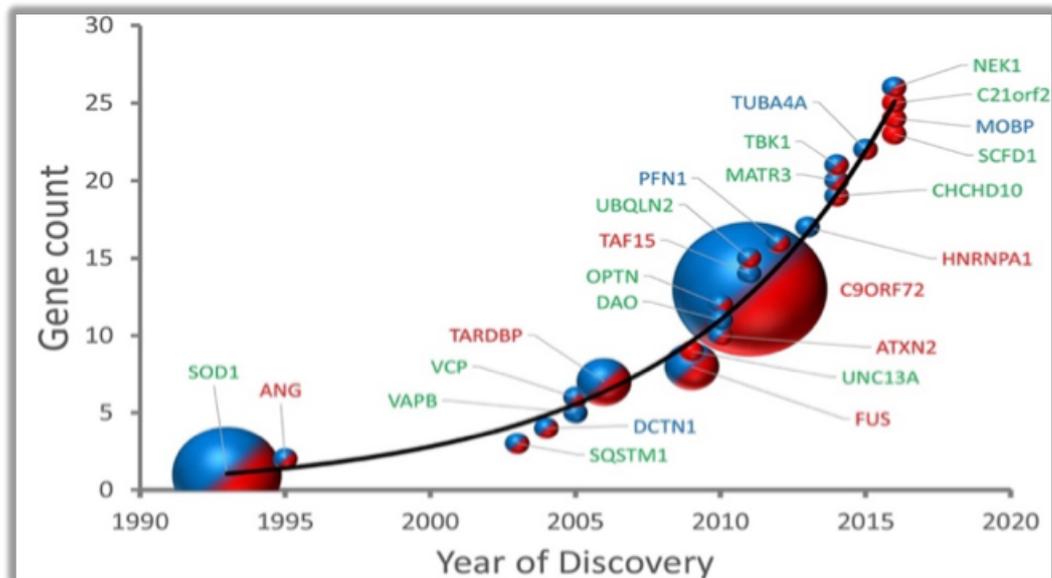


Figura 2.2. **Descubrimiento de genes asociados a ELA desde 1990.** El tamaño de cada círculo refleja la proporción de todos los casos de ELA familiar asociados con ese gen. Los círculos azules indican genes asociados solo con ELA familiar, los círculos rojos indican genes asociados solo con ELA esporádica y los círculos que son mitad azul y mitad rojo indican genes asociados tanto con ELA familiar como esporádica. Cada uno de estos genes está mutado en más de una familia afectada por ELA o en múltiples casos no relacionados de ELA esporádica

Fue en 1993 cuando se descubrió el primer gen asociado a ELA, el gen de la superóxido dismutasa con cobre y zinc (Cu/Zn SOD), localizado en el cromosoma 21q22.1 y responsable de codificar para la proteína SOD1 citosólica de carácter antioxidante (Rosen et al., 1993). Mutaciones en este gen aparecen en un 15% de los casos de ELAF y un 2% de ELAE (Volk et al., 2018). *SOD1* es uno de los genes más estudiados con más de 180 mutaciones descritas hasta la fecha, aunque no está claro si todas las mutaciones son patógenas y, por tanto, causantes de ELA (Mathis et al., 2019). El fenotipo, duración y gravedad de la enfermedad pueden diferir significativamente según las mutaciones involucradas. Por ejemplo, se observa una rápida progresión y tiempos de supervivencia más cortos en afectados con las variantes A4V, H43R, L84V, G85R N86S y G93A, mientras que las variantes G93C, D90A o H46R muestran generalmente una esperanza de vida más larga (Yamashita & Ando, 2015). En un principio se consideró que las mutaciones en el gen implicaban un fallo en la función de la enzima SOD1

produciéndose un aumento de radicales libres que resultarían tóxicos para las células. Durante años ha habido mucho debate sobre el papel causal de esta enzima en la ELA, pero se ha demostrado que no es la pérdida de función de la enzima la causante de la enfermedad sino la formación de agregados que afectan a diversos procesos moleculares y celulares (Robberecht & Philips, 2013). Estudios recientes sugieren que estos agregados proteicos pueden tener propiedades semejantes a los priones o prion-like (Ayers et al., 2016); según esta hipótesis, la proteína mutada o de tipo salvaje mal plegada se propagaría a lo largo de las vías anatómicas y transmitiría sus propiedades de plegamiento erróneo a las proteínas nativas produciéndose una agregación tóxica (Mathis et al., 2019).

Otro gen asociado a ELA es el gen *TARDBP* (TAR DNA-Binding Protein) que codifica para la proteína TDP-43, proteína TAR de unión a DNA/RNA. Se asoció a ELA y DFT al descubrir que la proteína TDP-43 era el componente mayoritario de las inclusiones ubiquitinizadas citoplasmáticas presentes en las neuronas degeneradas (Kabashi et al., 2008; Neumann et al., 2006; Rutherford et al., 2008). A pesar de ser el principal componente de los agregados proteicos, mutaciones en este gen solo se asocian con un 4% de ELAF y con 1% ELAE (Volk et al., 2018). Los mecanismos por los cuales mutaciones en TDP-43 conducen al desarrollo de la ELA no se han aclarado del todo. Numerosos estudios sugieren que es debido tanto a fenómenos de pérdida como de ganancia de función.

Otra proteína de unión a RNA asociada a ELA es FUS (Fused in Sarcoma) (Vance et al., 2009), mutaciones en el gen son causa de un 5% ELAF y un 0.5% ELAE (Laferrière & PolymenidouPhD, 2015). Se ha descrito una frecuencia alta de mutaciones de novo en este gen en casos de ELA esporádica con inicio antes de los 35 años (Volk et al., 2018), además de asociarse a una rápida progresión de la enfermedad (Oskarsson et al., 2018).

A pesar de que desde el 2006 se relacionó con la ELA el gen *C9orf72* (Chromosome 9 open Reading frame 72) localizado en el cromosoma 9p21, no es hasta 2011 cuando se descubrió la mutación patógena responsable de la mayoría de los casos de ELA y DFT (DeJesus-Hernandez et al., 2011; Renton et al., 2011). Esta mutación consiste en una repetición masiva del hexanucleótido GGGGCC (G_4C_2) en una zona no codificante del gen; mientras personas sanas tienen de 4-20 repeticiones de este fragmento, personas con ELA o DFT pueden llegar a tener cientos o miles de repeticiones (Laferrière & PolymenidouPhD, 2015). Mutaciones en este gen se asocian con un 40% de los casos de ELAF y un 7% de los casos de ELAE en personas con ascendencia europea y son extremadamente raras en personas con otro origen. Además, se ha relacionado esta mutación con un inicio de ELA bulbar (Volk et al., 2018). No está claro el mecanismo patogénico de *C9orf72* y se han propuesto tres procesos al respecto. Primero,

pérdida de función debido a la haploinsuficiencia de la proteína C9orf72. En segundo lugar, formación de especies de RNA intranucleares tóxicas por secuestro de proteínas de unión a RNA y, tercero, generación de proteínas repetidas de dipéptidos (DPR) a través de un mecanismo de traducción no canónico conocido como traducción asociada a repetición no dependiente de AUG (RAN translation) (Balendra & Isaacs, 2018).

Otros genes relacionados con la ELA pero con una incidencia menor que los anteriormente comentados son los genes *VCP* (valosin-containing protein), *VAPB* (Vesicle-associated membrane protein), *ANG* (Angiogenin), *SETX* (Senataxin), *ALS2* (alsin Rho guanine nucleotide exchange factor), *TBK1* (TANK-binding kinase) (Tabla 1). Asimismo, se han descrito genes potencialmente susceptibles de ELA como es el caso de *NEK1* (NIMA related kinase 1), *NEFH* (neurofilament, heavy polypeptide), *TAF15* (TATA box-binding protein-associated factor 15), *DCTN1* (dynactin-1), *KIF5A* (kinesin family member 5A), *SPAST* (spastin), *CCNF* (CYCLIN F), *ELP3* (elongator acetyltransferase complex subunit 3), y *C21orf2* (Chromosome 21 open reading frame 72)(Mathis et al., 2019).

Por otro lado, algunos pacientes pueden portar más de una mutación rara causante de la enfermedad. Estudios han mostrado que el número de pacientes con múltiples mutaciones asociadas a ELA es mayor de lo que se puede esperar por azar, basado en las frecuencias de mutación individuales de los genes respectivos, reforzando así la idea del componente oligogénico de la ELA (Nguyen et al., 2018). Aunque es un tema en continua investigación que requiere más estudios epidemiológicos y genéticos para confirmarla.

El hecho de que la gran mayoría de los casos de ELAE sean de causa desconocida y la gran variabilidad que existe tanto en la edad de inicio como en la supervivencia entre los pacientes, incluso en casos de ELAF que comparten la misma mutación, sugiere que existen otros factores que también pueden estar influenciando el fenotipo (Robberecht & Philips, 2013). Numerosos estudios han centrado la atención en la posible implicación de factores de riesgo ambientales en la patogénesis de la ELA. La lista de factores propuestos es muy amplia, como exposición a químicos, tabaquismo, metales pesados, radiación, campos electromagnéticos, virus, hongos, ejercicio e incluso componentes de la dieta (Ingre et al., 2015; Nowicka et al., 2019; Paez-Colasante et al., 2015). A pesar de existir algunas evidencias, la relación entre riesgo genético-factores ambientales y fenotipo sigue siendo bastante desconocida, en parte porque los factores ambientales pueden cambiar con el tiempo y registrarlos resulta muy complejo.

En los últimos años han cobrado relevancia los mecanismos epigenéticos que median esta interacción genes-factores ambientales. Se centran en el estudio de las modificaciones que suceden en la expresión génica como cambios en los niveles de metilación (Lu et al., 2013) y en microRNAs (miRNAs) que modulan los procesos fisiopatológicos (Qureshi & Mehler, 2013) y, que se encuentran desregulados tanto en modelos animales como en pacientes de ELA. Se ha descrito un aumento en la metilación del DNA en sangre y tejido neural de pacientes independientemente de la edad de inicio y un cambio en el patrón de metilación del gen *C9orf72* (Tremolizzo et al., 2014; Belzil et al., 2014).

Los miRNAs son moléculas de RNA no codificante conservados evolutivamente que participan en la regulación post-transcripcional de la expresión génica. Son capaces de reprimir la expresión de RNAs mensajeros (mRNA) mediante una interacción dependiente de la secuencia, facilitando la degradación de sus mRNAs diana y/o inhibiendo su traducción (Bartel, 2009). Los miRNAs se encuentran alterados con frecuencia en numerosas afecciones, incluidos los trastornos del Sistema Nervioso Central (SNC) (Jin et al., 2013). Respecto a la ELA, numerosos miRNAs se han relacionado con la enfermedad como es el caso de miR-155, aumentado en médula espinal tanto en casos de ELAE como ELAF (Koval et al., 2013) y miR-206, regulador clave entre las motoneuronas y el músculo (Williams et al., 2009), que se encuentra aumentado en plasma en el modelo murino SOD1 y en pacientes con ELAE, convirtiéndolo en un potencial biomarcador de la enfermedad (Toivonen et al., 2014).

Un mejor conocimiento de estos mecanismos epigenéticos puede ser muy útil para profundizar en el origen de la enfermedad y para orientar sobre posibles objetivos y enfoques terapéuticos (Zufiría et al., 2016).

2.1.3. Epidemiología

La incidencia mundial de la ELA es de 1.75 casos por cada 100.000 habitantes al año (Marin et al., 2017). Estudios epidemiológicos sugieren que los hombres tienen más predisposición que las mujeres con un ratio 1.2-1.5:1 (Ingre et al., 2015). Aunque puede aparecer a cualquier edad, la media de inicio suele ser de 50-60 años para ELA esporádica y 40-60 años para ELA familiar (Ingre et al., 2015). No obstante, se ha observado que el riesgo de padecer ELA aumenta con la edad, teniendo un pico máximo a los 75 años (Logroscino & Piccininni, 2019).

Numerosos estudios apuntan que la incidencia de la ELA varía según el origen ancestral y la distribución geográfica. Estudios en poblaciones europeas muestran una incidencia de 2-3 casos cada 100.000 personas mientras que en Asia es de 0.7-0.8 (Hardiman et al., 2017). Una excepción a estas zonas de Asia son la isla de Guam y la península de Kii (Japón) cuya incidencia ha sido desde hace más de 30 años muy alta pero, aunque existen diferentes teorías, se desconocen las causas exactas de este incremento en la incidencia (Logroscino & Piccininni, 2019).

En España la prevalencia es de 5.4 casos cada 100.000 habitantes; se estima que cada día se diagnostican 3 nuevos casos y que en nuestro país hay más de 4000 personas afectadas por ELA (www.ffluzon.org). Debido a la mayor esperanza de vida de la población mundial, sobre todo en los países más desarrollados, se prevé que la incidencia de la ELA aumentará hasta un 69 % en los próximos 20 años (Arthur et al., 2016).

2.1.4. Sintomatología

Los síntomas de la ELA empiezan cuando las conexiones entre el músculo y motoneurona fallan, el axón se retrae produciéndose la denervación del músculo. Inicialmente, este hecho es compensado por una reinervación de axones de motoneuronas adyacentes que son más resistentes a la degeneración. Conforme la enfermedad progresa, este mecanismo compensatorio no es suficiente y termina afectando a todas las motoneuronas (Robberecht & Philips, 2013). La heterogeneidad clínica es una de las características de la ELA, no todas las personas con ELA experimentan los mismos síntomas ni la misma progresión. Sin embargo, todas experimentan una debilidad, atrofia y parálisis muscular progresiva como consecuencia de la neurodegeneración. La variabilidad fenotípica depende de diversos factores como la edad de aparición, lugar de inicio, progresión, afectación del tipo de motoneurona (superior y/o inferior) y la coexistencia con una DFT. Incluso en familias con una causa monogénica de ELA, la presentación de la enfermedad es muy variable, evidenciando la existencia de factores modificadores de la enfermedad (Van Damme et al., 2017).

La mayoría de los afectados (alrededor 70%) presenta ELA de inicio espinal, es decir, se ven afectadas en un primer momento las extremidades inferiores. Un 25% de los afectados presentan ELA de inicio bulbar y un 5% presenta inicio de tronco o manifestación de síntomas respiratorios. Tanto los síntomas como el pronóstico dependen, entre otros factores, del sitio de inicio y el área neurológica afectada (Nowicka et al., 2019) como puede observarse en la Tabla

2.2. Debido a la diferente progresión y carácter multifactorial de la enfermedad se considera que “hay tantos tipos de EL como personas afectadas”.

Tabla 2.2. Fenotipos clínicos, síntomas y pronóstico de la ELA (modificado de Nowicka et al., 2019)

| Fenotipo | Región | Síntomas | Pronóstico |
|------------------------------------|--------------------|---|---|
| Inicio en extremidades | MNS | Espasticidad, debilidad, aumento reflejos osteotendinosos | Supervivencia 5-8 años |
| | MNI | Fasciculaciones, emaciación, debilidad distal ascendente gradual | |
| Inicio bulbar | MNS | Disartria espástica, habla lenta, laboriosa y distorsionada | Supervivencia 2-5 años |
| | MNI | Disartria, disfagia, fasciculaciones, debilidad lengua | |
| Esclerosis lateral primaria | MNS | Tetraparesia espástica ascendente con afectación del habla, urgencia urinaria | Progresión lenta, supervivencia décadas |
| Atrofia muscular progresiva | MNI | Subtipo peor definido. Debilidad asimétrica y emaciación | 5 años |
| ELA-DFT | MNS, MNI córtez | Presentación con DFT. Desarrollo tardío síntomas de ELA | Supervivencia menor 3 años |

2.1.5. Diagnóstico

A día de hoy no existe una prueba específica de diagnóstico para la ELA. Este se complica por la gran variabilidad interindividual existente en el inicio de los síntomas y progresión de la enfermedad. Además, los síntomas iniciales pueden ser similares a otras enfermedades de la médula espinal, neuropatías y síndromes neurológicos, lo que lleva a la necesidad de hacer un diagnóstico diferencial entre la ELA y otros síndromes. Evidencias recientes apuntan a una implicación temprana del músculo en la enfermedad por lo que también se debe hacer diagnóstico diferencial de miopatías que asemejan a la ELA (Campanari et al., 2019). Todo esto conlleva un arduo camino de investigación clínica que retrasa el diagnóstico varios meses desde que el paciente acude a la consulta del neurólogo con los primeros síntomas.

El diagnóstico diferencial se basa en datos clínicos, exploración neurológica y pruebas diagnósticas complementarias de neuroimagen, electrodiagnóstico, inmunobioquímica (sangre, orina, líquido cefalorraquídeo (LCR), biopsias de músculo y/o nervio) y estudio genético en casos de sospecha de ELAF (Campanari et al., 2019).

Debido a la heterogeneidad de la enfermedad, en 1994 la Federación Mundial de Neurología creó unas directrices internacionales, los “Criterios de El Escorial”, tanto para el diagnóstico como para la inclusión de pacientes en ensayos clínicos que han ido sufriendo varias revisiones a lo largo de los años. En 1998, se realizó la primera revisión bajo el nombre de “criterios Airlie House” con la finalidad de conseguir mayor sensibilidad en el diagnóstico mediante la inclusión de pruebas laboratoriales como herramienta para el diagnóstico diferencial (Brooks et al., 2000). Debido a la baja precisión clínica para el diagnóstico que aportaban estos criterios, en el año 2008 se hizo una nueva revisión, criterios de Awaji-Shima, en la que se incluyeron pruebas electrofisiológicas con la finalidad de aumentar más la sensibilidad y rapidez del diagnóstico. Una de las aportaciones más importantes fue la inclusión de fasciculaciones con evidencia de reinervación como síntoma o equivalencia de denervación activa (Al-Chalabi et al., 2017).

Sin embargo, muchas veces estos criterios siguen siendo insuficientes desde un punto de vista práctico. Es fundamental acortar el tiempo de diagnóstico para que los afectados puedan ser tratados lo antes posible desde un punto de vista multidisciplinar ya que ayudará a mejorar su calidad de vida.

2.1.6. Patogenia

La causa y mecanismos moleculares exactos que provocan la degeneración y muerte de las motoneuronas se desconocen. Un aspecto fundamental para la comprensión de la patogénesis es la relación existente entre la disfunción de las motoneuronas superiores e inferiores. A este respecto, se han propuesto tres teorías sobre el proceso de neurodegeneración en la ELA: “dying-forward”, “dying-back” y degeneración independiente (Figura 2.3). La hipótesis “dying-forward” sugiere que la ELA es principalmente un trastorno de la neurona motora cortical que interviene en la degeneración anterógrada de las células del asta anterior a través de la excitotoxicidad del glutamato (Eisen & Weber, 2001). Por el contrario, la hipótesis “dying-back” propone que la neurodegeneración comienza en las motoneuronas inferiores y se extiende retrógradamente desde la unión neuromuscular al soma celular donde ejerce efectos nocivos (Fischer et al., 2004).

Por último, la hipótesis de degeneración independiente sugiere que las motoneuronas superiores e inferiores degeneran de modo simultáneo e independiente, tal vez de manera estocástica (Geevasinga et al., 2016). Actualmente, la más aceptada es la teoría “dying-back”; además, diversos estudios tanto en pacientes como en ratones transgénicos han mostrado que la retracción axonal y denervación ocurren en estadios muy tempranos, incluso antes de la pérdida de cuerpos neuronales (Fischer et al., 2004; Robberecht & Philips, 2013).

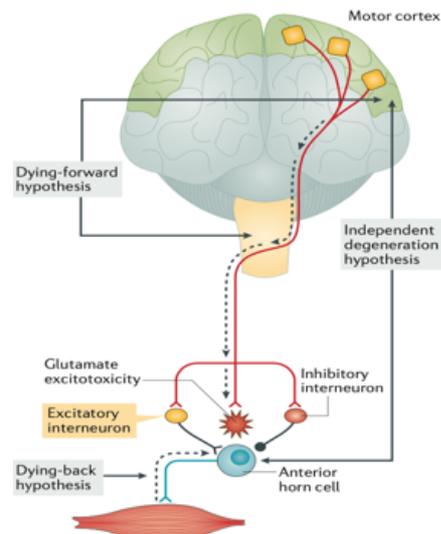


Figura 2.3. Hipótesis actuales del inicio y progresión de la ELA (Geevasinga et al., 2016)

La creación de modelos experimentales basados en mutaciones presentes en afectados de ELA ha contribuido a profundizar en la patología y a identificar alteraciones en funciones celulares que originan numerosas teorías sobre el origen de la enfermedad (Figura 4). Antiguamente se creía que la ELA era una enfermedad puramente motora, pero actualmente se acepta que es un proceso multifactorial complejo en el que intervienen numerosos mecanismos que están interrelacionados

A continuación, se describen más detalladamente los mecanismos patológicos involucrados en la ELA hasta el momento.

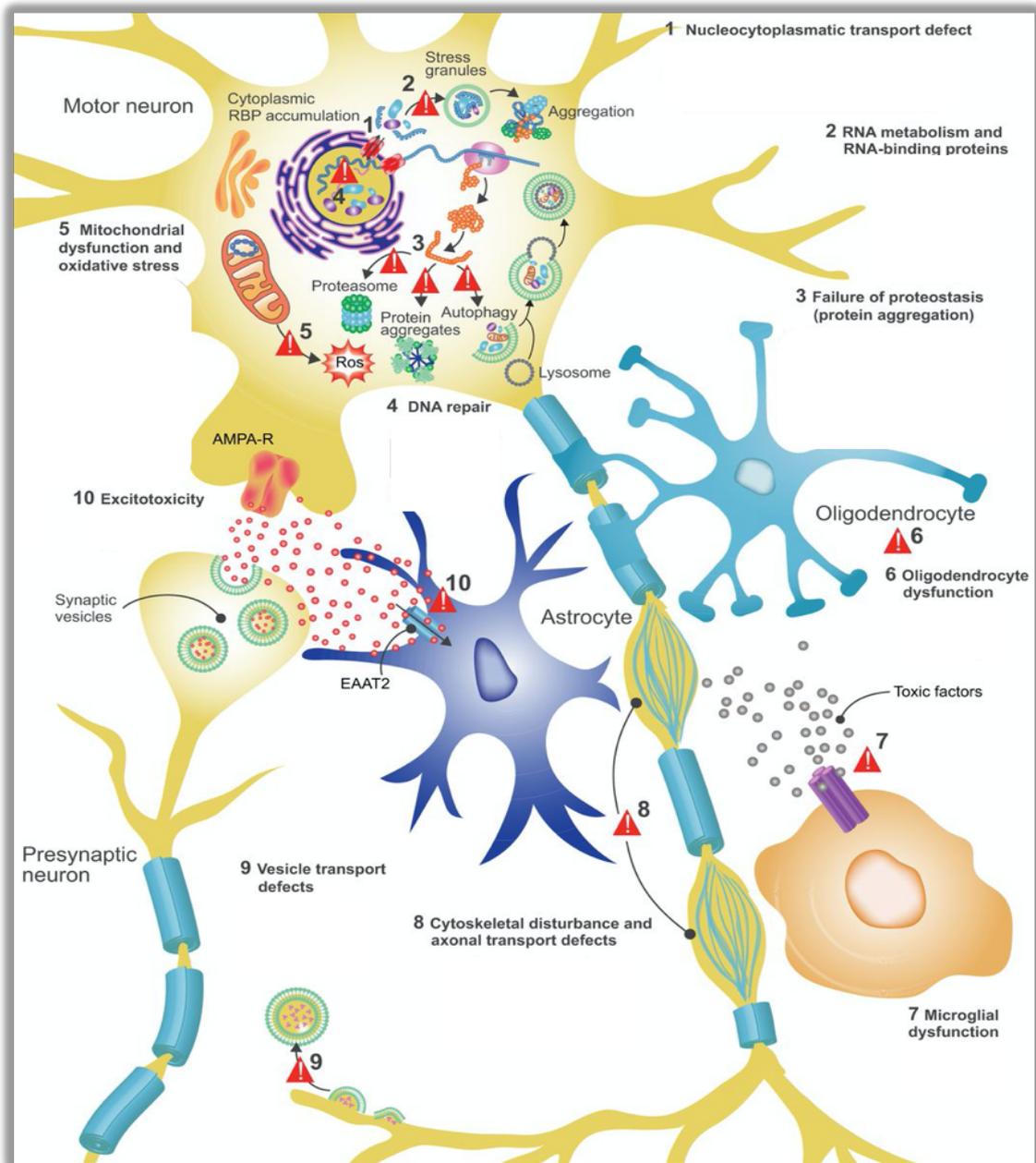


Figura 2.4. **Patogenia de la ELA y mecanismos patogénicos propuestos.** A nivel de patología celular, la ELA se caracteriza por retracción axonal y pérdida del cuerpo celular de las neuronas motoras superiores e inferiores, rodeadas de astrogliosis y microgliosis, con inclusiones positivas para ubiquitina y p62 en las neuronas supervivientes. Los mecanismos de enfermedad propuestos que contribuyen a la degeneración de las neuronas motoras son: (1) alteraciones en el transporte nucleocitoplasmático de moléculas de RNA y proteínas de unión a RNA, (2) metabolismo del RNA, (3) proteostasis alterada con acumulación de proteínas agregadas (TDP-43, FUS, SOD1, DPR), (4) reparación alterada del DNA, (5) disfunción mitocondrial y estrés oxidativo, (6) disfunción y degeneración de oligodendrocitos, (7) neuroinflamación, (8) transporte axonal defectuoso, (9) transporte vesicular defectuoso, (10) excitotoxicidad mediada por glutamato (modificado de Van Damme et al., 2017)

2.1.6.1. Excitotoxicidad mediada por glutamato

Fue uno de los primeros mecanismos alterados propuestos en la ELA. El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio en el Sistema Nervioso Central, es liberado al espacio extracelular por los terminales presinápticos y activa receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) y AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico) facilitando la entrada de Ca^{2+} y Na^+ en la neurona postsináptica. Los estímulos excitatorios deben ser rápidos y transitorios para conseguir un correcto funcionamiento; para ello, el glutamato es retirado rápidamente de la hendidura postsináptica por transportadores recaptadores de glutamato. El más abundante es el EAAT2/GLT1 (aminoácido excitador tipo 2 Transportador) presente en astrocitos (Taylor et al., 2016).

La excitotoxicidad se produce al mantenerse niveles elevados de glutamato en el espacio extracelular debido a una pérdida selectiva de EAAT2, lo que conlleva una hiperactivación de los receptores postsinápticos (Riancho et al., 2019); produciéndose una entrada masiva y constante de Ca^{2+} en el interior de la neurona que provoca una alteración de la homeostasis del calcio, activación de rutas proteolíticas y generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Esta excitotoxicidad puede además dañar orgánulos intracelulares y aumentar mediadores proinflamatorios (Kiernan et al., 2011). Las motoneuronas son muy sensibles al daño excitotóxico por glutamato ya que carecen de proteínas fijadoras de Ca^{2+} y además son ricas en receptores AMPA, que las hace más permeables al calcio y por tanto más vulnerables a un desajuste del mismo (Laslo et al., 2001).

Existen algunos hallazgos clave que respaldan el papel de la excitotoxicidad en la fisiopatología de la ELA. Se han observado niveles altos de glutamato en LCR en algunos pacientes de ELA (Ferraiuolo et al., 2011), así como una disminución en la expresión de EAAT2 tanto en modelos murinos como en pacientes con ELAF y ELAE (Hardiman et al., 2017). Además, estudios electrofisiológicos han demostrado hiperexcitabilidad motora en estadios tempranos junto con una permeabilidad anormal al calcio de los receptores AMPA. Por otro lado, la sobreexpresión de EAAT2 en ratones transgénicos SOD1 mutantes retrasó la aparición de déficits motores (Turner et al., 2013). Riluzole, primer fármaco aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) como tratamiento para la ELA, tiene actividad antiglutamatérgica aunque su mecanismo preciso se desconoce.

2.1.6.2. Alteración del transporte axonal

Las motoneuronas son células altamente polarizadas con axones de gran longitud por lo que el transporte axonal, dependiente de ATP, es vital para el abastecimiento de componentes esenciales como RNA, proteínas y orgánulos celulares tanto a los compartimentos axonales como a las estructuras sinápticas de la unión neuromuscular (Ferraiuolo et al., 2011). Dicho transporte ocurre en dos direcciones: anterógrado, realizado desde el soma hacia la unión neuromuscular y mediado por kinesinas dependientes de microtúbulos y retrógrado, mediado por dineínas y realizado desde el axón hacia el soma (Pasinelli & Brown, 2006).

La alteración en el citoesqueleto axonal, en especial los neurofilamentos, es un evento que se da tanto en la ELAE como ELAF (Taylor et al., 2016). Diversos estudios en pacientes y animales modelo han demostrado que la retracción axonal y denervación ocurre en estadios muy tempranos, antes incluso de que la pérdida de cuerpos neuronales se haga evidente (Robberecht & Philips, 2013). En el modelo murino SOD1G93A se ha observado como en etapas iniciales se alteran ambos tipos de tráfico y que esta alteración es específica de la carga que se transporta, estando especialmente comprometido el transporte anterógrado mitocondrial (Riancho et al., 2019). Asimismo, cuando surge una alteración en la función mitocondrial, se produce una disminución en el tráfico axonal mitocondrial que puede afectar al transporte de otras sustancias debido a la falta de energía (Bilsland et al., 2010). Esta alteración axonal junto con la disfunción mitocondrial, podría ser la causa de la axonopatía por “dying-back” como consecuencia del agotamiento energético (De Vos et al., 2007).

El mecanismo causante de la alteración en el transporte axonal no está claro, clásicamente se ha considerado que las alteraciones en este transporte eran secundarias a múltiples desórdenes como disfunción mitocondrial, excitotoxicidad y agregados proteicos; sin embargo, en los últimos años se han identificado mutaciones en genes que codifican proteínas directamente implicadas en el transporte axonal como *DCTN* (dynactin-1), *PFN1* (Profilin-1), *TUBA4A* (tubulin alpha-4A), *KIFAP3* (Kinesin Associated Protein 3), *NEFH* (neurofilament heavy), que podrían estar provocando la alteración de dicho transporte (Hardiman et al., 2017).

2.1.6.3. Desregulación del tráfico endosomal

El tráfico endo/lisosomal es una función biológica que se encuentra afectada en diversas enfermedades neurodegenerativas, incluida la ELA. La endocitosis es el proceso por el cual moléculas extracelulares son captadas por la célula mediante la invaginación de su membrana plasmática y posterior formación de vesículas para ser transportadas a su interior. Una vez en el citoplasma, son conducidas hasta su destino final mediante el tráfico endosomal, un complejo sistema de orgánulos en el que intervienen el citoesqueleto, retículo endoplasmático y aparato de Golgi. Alteraciones en este proceso pueden ocasionar lisosomas disfuncionales y una acumulación de sustancias no degradadas resultando tóxicas para la célula (Schreij et al., 2016).

Se han descrito mutaciones en genes relacionados con ELA que participan en la regulación del tráfico endosomal, como por ejemplo el gen *Alsina (ALS2)*, asociado con una forma juvenil autosómica recesiva de ELA. Se ha relacionado una pérdida de la función del gen con una reducción en el tráfico endosomal, mayor conversión de endosomas en lisosomas y, por tanto, mayor degradación de los productos que se encuentran en su interior como el caso de los receptores de glutamato internalizados (Ferraiuolo et al., 2011). Asimismo, se ha demostrado que la pérdida de función de TDP-43 altera los endosomas dendríticos e inhibe el tráfico endosomal (Schwenk et al., 2016). Otros genes descritos en afectados de ELA cuyas mutaciones producen una alteración en este tipo de tráfico son *C9orf72* (chromosome 9 open reading frame 72), *CHMP2B* (charged multivesicular body protein 2B), *SPG11* (spastic paraplegia 11), *UNC13A* (unc-13 homolog A) y *FIG4* (phosphoinositide 5-phosphatase) (Burk & Pasterkamp, 2019; Farg et al., 2014).

2.1.6.4. Disfunción mitocondrial

Las mitocondrias tienen un papel esencial en la supervivencia celular y metabolismo intermedio. Son productoras de ATP y participan en la biogénesis de fosfolípidos, homeostasis del calcio y control de la apoptosis intrínseca además de ser fuente de producción de ROS. Un mal funcionamiento mitocondrial conlleva efectos pleiotrópicos en las células, especialmente en las neuronas (Shi et al., 2010), debido a su alta actividad metabólica y su consecuente dependencia de la fosforilación oxidativa. Por lo tanto, la disfunción mitocondrial puede conducir a un fallo bioenergético, estrés oxidativo o apoptosis y provocar la muerte celular (Cozzolino & Carrì, 2012).

La implicación de la mitocondria en la patogenia de la ELA ha sido ampliamente estudiada. Sin embargo, aunque se ha demostrado una relación entre la ELA y determinadas alteraciones mitocondriales (Figura 2.5), no se conoce exactamente el papel que tienen en el comienzo y desarrollo de la enfermedad.

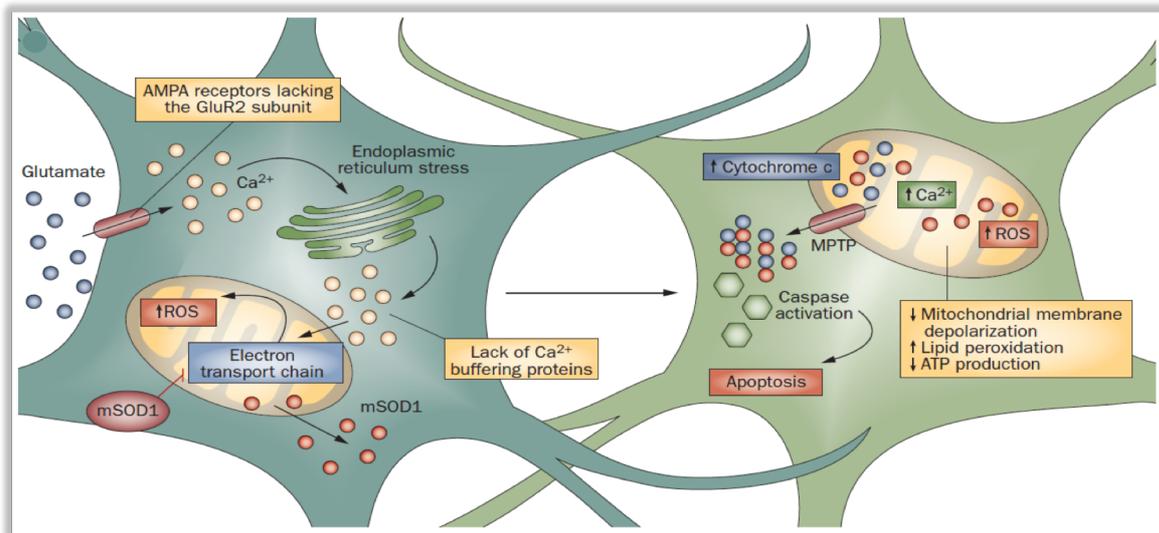


Figura 2.5. Disfunción mitocondrial en la ELA (Ferraiuolo et al., 2011).

Existen diferentes mecanismos celulares para garantizar una homeostasis mitocondrial adecuada; estos sistemas de calidad mitocondrial eliminan proteínas dañadas a través de la proteostasis y orgánulos y componentes mitocondriales dañados a través de la mitofagia, una forma especializada de autofagia. En la ELA, las motoneuronas no pueden reparar o eliminar las mitocondrias dañadas y mantener la homeostasis, produciéndose un acúmulo de mitocondrias. Este hecho sugiere que el sistema de calidad es ineficaz y podría ser el resultado de una interferencia con las proteínas mutadas o de una sobrecarga del sistema por un daño mitocondrial constitutivo y extenso (Palomo & Manfredi, 2015), llegando finalmente a producirse toxicidad neuronal por una producción excesiva de radicales libres, liberación de factores proapoptóticos y obstrucción de los mecanismos proteostáticos y autofágicos. Asimismo, las mitocondrias también son esenciales para controlar la apoptosis, ya que la apertura del poro de transición de permeabilidad y la liberación del citocromo C del espacio intermembrana mitocondrial es crucial para la activación de la cascada de caspasas (Mancuso & Navarro, 2015).

Se han descrito alteraciones mitocondriales morfológicas y funcionales tanto en pacientes como en modelos celulares y animales de formas familiares de ELA. Estudios en

modelos de ratón SOD1 mutante (mSOD1) evidencian la aparición de mitocondrias con crestas dilatadas y desorganizadas en estadios presintomáticos (Ferraiuolo et al., 2011) además de agregados proteicos en el espacio intermembranoso de la mitocondria, lo que conlleva una peor importación de proteínas (Higgins et al., 2003). También se ha observado en pacientes y animales modelo de la enfermedad alteraciones en la cadena respiratoria asociadas a un daño oxidativo en proteínas y lípidos mitocondriales (Parone et al., 2013) y, como se ha comentado antes, defectos en el transporte axonal de mitocondrias (Bilsland et al., 2010).

Por otro lado, la función mitocondrial también se encuentra comprometida en casos de ELAF de genes como *FUS*, *OPTN* (Optineurin), *TARDBP*, *VCP*, *CHCHD10* (coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing protein 10), *SQSTM1 /p62* (sequestosome 1) así como en casos de ELAE (Cozzolino et al., 2013; E. F. Smith et al., 2019).

2.1.6.5. Desregulación de la homeostasis proteica

Una característica patológica común de muchos trastornos neurodegenerativos es el plegamiento anómalo y la consecuente agregación de proteínas intracelulares. Por tanto, una de las funciones biológicas objeto de un amplio estudio es la proteostasis celular y su relación en el desarrollo de las patologías. La proteostasis comprende vías que regulan la biogénesis, el tráfico y la degradación de proteínas. La adecuada regulación de estas vías es esencial para el mantenimiento de la homeostasis del proteoma, garantizando así una correcta función celular y respuesta ante cualquier estímulo. Las motoneuronas poseen un proteoma especialmente vulnerable, de modo que la mutación de algún componente o un estrés continuado produce alteraciones que conducen a defectos funcionales como alteraciones en excitabilidad, disfunción mitocondrial, estrés del retículo endoplásmico (RE) y agregación de proteínas (Yerbury et al., 2020).

En la ELA, tanto en formas familiares como esporádicas, varias especies de proteínas son disfuncionales evidenciándose este fenómeno por la formación de agregados, eventos de escisión anormales o modificaciones postraduccionales como ubiquitinación o hiperfosforilación. Estos cambios podrían ser consecuencia de mutaciones en las proteínas afectadas y/o fenómenos secundarios inducidos por el proceso subyacente de la enfermedad (Peters et al., 2015).

La presencia de inclusiones intracelulares positivas para ubiquitina es una característica en la ELA desde etapas tempranas. Conforme progresa la enfermedad, se forman agregados más

denso en localizaciones celulares anómalas, lo que indica que se encuentran alterados los mecanismos moleculares de mantenimiento y degradación como autofagia y sistema ubiquitin-proteasoma (Robberecht & Philips, 2013). No está claro el papel exacto que ejercen estos agregados, puede ser que estas inclusiones provoquen directamente citotoxicidad, que solo sean productos inocuos derivados de la neurodegeneración o que por el contrario sea una forma de protección de la célula para reducir la cantidad intracelular de proteínas tóxicas (Peters et al., 2015).

Uno de los componentes más frecuentes en estos agregados, tanto en casos familiares como esporádicos, es la proteína SOD1. Mutaciones en el gen producen un plegamiento incorrecto de las proteínas que son ubiquitinizadas para ser degradadas a través del proteasoma. Sin embargo, una gran proporción de estas proteínas escapan de este proceso regulatorio (Figura 2.6), dando lugar a agregados que afectan a procesos como la respiración mitocondrial y el transporte axonal que interfieren con la proteostasis provocando una activación autofágica secundaria (Robberecht & Philips, 2013). De hecho, se ha observado un mayor número de autofagosomas en médula espinal tanto en afectados de ELA como en modelos animales (Morimoto et al., 2007; Sasaki, 2011).

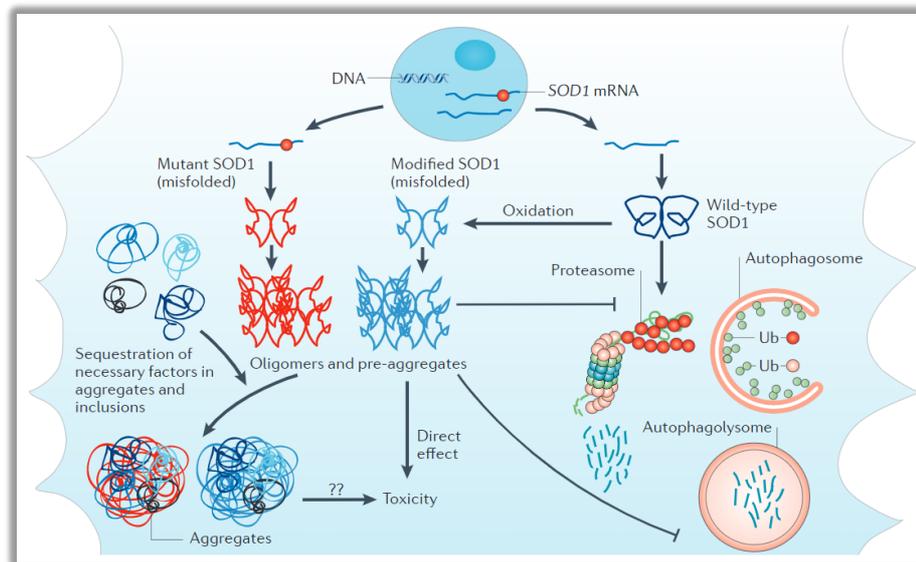


Figura 2.6. Posible patogenia en el mecanismo de toxicidad inducido por agregados de SOD1 mal plegada (Robberecht & Philips, 2013).

La alteración de estos sistemas de degradación proteica y la consecuente acumulación de proteínas mal plegadas provoca la activación de la vía de respuesta del estrés del RE. En primer lugar, las chaperonas del RE reconocen las proteínas anormalmente plegadas para posteriormente corregir su plegamiento y devolverlas a su conformación fisiológica. En el caso de la ELA, este proceso termina por saturarse y fallar, y esto exacerba todavía más la acumulación de proteína mutada, pudiendo desencadenar una señalización apoptótica (Blokhuys et al., 2013).

Otra proteína clave para el estudio de la patobiología de la ELA asociada a la agregación proteica ha sido TDP-43. Es el principal componente de las inclusiones citoplasmáticas tanto en células neuronales como no neuronales en la mayoría de los afectados de ELAE y ELAF, excepto en casos con mutación en el gen *SOD1* y *FUS* (Mackenzie et al., 2010), lo que podría indicar que se produce una cascada neurodegenerativa alternativa en estos casos genéticos de ELA. TDP-43 es una proteína de la familia de las proteínas de unión RNA y DNA que se localiza predominantemente en el núcleo. En situaciones de estrés, cambia su localización al citoplasma donde se une a gránulos de estrés, impidiendo su vuelta al núcleo. Si la situación se resuelve, los gránulos de estrés son eliminados por chaperonas y disgregasas que liberan el TDP-43 para que pueda retornar al núcleo. Sin embargo, si la situación de estrés se mantiene, los gránulos pueden acumularse de modo irreversible lo que lleva a una pérdida de función nuclear de la proteína (Robberecht & Philips, 2013). Además, otra proteína de unión a RNA que se encuentra en inclusiones citoplasmáticas en pacientes con ELA es FUS (Hewitt et al., 2010).

Cabe destacar que las proteínas TDP-43 y FUS presentan dominios de tipo priónico (prion-like domains), de modo que actuarían como modelo e inducirían la agregación de proteínas nativas, proceso que se conoce como “cross-seeding”. Este fenómeno podría explicar la heterogeneidad proteica encontrada en los agregados. Asimismo, se ha sugerido que este mecanismo es capaz de transmitirse a células vecinas donde induciría la formación de más agregados. De este modo, la enfermedad se propagaría de célula a célula y a través de regiones contiguas, lo que podría explicar las observaciones clínicas de afectación de regiones anatómicas cercanas al foco de inicio (Hardiman et al., 2017; Robberecht & Philips, 2013).

Además de los genes anteriormente comentados, se han descrito mutaciones en otros genes relacionados con ELA que codifican componentes y reguladores de los sistemas de degradación proteica como *C9orf72*, *CCNF*, *VCP*, *OPTN*, *VAPB*, *UBQLN2* (Ubiquilin-2), y *SQSTM1/p62* (Yerbury et al., 2020). Por otro lado, se ha asociado una desregulación de las

proteínas chaperonas con mutaciones en *SOD1* y *TARDBP* (Bergemalm et al., 2010; Chang et al., 2013).

2.1.6.6. Alteración del metabolismo de RNA

El descubrimiento de mutaciones en genes como *TARDBP* y *FUS* y de la proteína TDP-43 como el componente mayoritario de las inclusiones citoplasmáticas en personas afectadas de ELA y DFT, sugiere que la alteración del metabolismo del RNA podría ser un mecanismo patológico importante en la ELA.

Los principales genes causales de ELA como *C9orf72*, *SOD1*, *TARDBP* y *FUS* participan en procesos clave del metabolismo del RNA como la transcripción, splicing alternativo, transporte, estabilización de RNAm y biogénesis de miRNAs (Butti & Patten, 2019). Muchas de las proteínas de unión a RNA asociadas a ELA son propensas a la agregación y contienen regiones de baja complejidad similares a priones (prion-like), que están involucrados en la formación y dinámica de gránulos de estrés. Son complejos transitorios RNA-proteína formados en respuesta a estrés celular que pueden secuestrar RNAm específicos y evitar su traducción, facilitando de este modo la supervivencia celular al detener la traducción de transcripciones no esenciales y proteínas proapoptóticas (Protter y Parker, 2016). Mutaciones en *TDP-43* y *FUS* se caracterizan por una translocación de sus proteínas del núcleo al citoplasma donde tienden a formar agregados con gránulos de estrés, dando como resultado la pérdida del procesamiento normal de sus RNA dianas (Amlie-Wolf et al., 2015; Y. Zhou et al., 2014) y, por tanto, una alteración en la traducción de proteínas.

Por otro lado, expansiones repetidas de *C9orf72* conducen a la formación de secuencias cuádruples (G_4C_2) que interactúan con factores de procesamiento de RNA (Haeusler et al., 2014) y a la formación de focos nucleares de RNA tóxicos que secuestran proteínas de unión a RNA esenciales y deterioran la maquinaria de procesamiento de RNA (Cooper-Knock et al., 2014; Lee et al., 2013). Además, estas expansiones podrían conducir a la formación de estructuras híbridas de DNA-RNA, aumentando así la susceptibilidad al daño del DNA y la inestabilidad del genoma (Haeusler et al., 2016; Santos-Pereira & Aguilera, 2015).

Además de estos genes más mayoritarios, se han descrito mutaciones en otros genes relacionados con menos casos de ELA pero que también participan en el metabolismo del RNA como *ATXN2* (ataxin 2), *MATR3* (matrin 3), *TAF15*, *SETX*, *ANG*, *TIA1* (T-cell-restricted intracellular antigen-1), *EWSR1* (Ewing sarcoma breakpoint region 1), *hnRNPA1* (heterogeneous nuclear

ribonucleoprotein A1) y *hnRNPA2 B1N* (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1) (Butti & Patten, 2019).

2.1.6.7. Reparación del DNA

La principal causa de daño al DNA en las neuronas son las especies reactivas de oxígeno (ROS) endógenas producidas por la respiración mitocondrial y otros procesos metabólicos. Se desencadenan modificaciones en la estructura del DNA que conducen a roturas de cadena sencilla y, con menos frecuencia, roturas de doble cadena (Madabhushi et al., 2014).

Las deficiencias en la reparación del DNA es otro mecanismo sugerido que puede contribuir a la patogénesis de la ELA, sobre todo a raíz del descubrimiento de mutaciones en dos de las proteínas vinculadas a ELA, TDP-43 y FUS, que intervienen en la prevención o reparación del daño del DNA asociado a la transcripción (Hill et al., 2016). FUS en particular parece jugar un papel importante, ya que participa en la reparación de roturas de DNA de doble cadena a través de mecanismos de recombinación homóloga (Wang et al., 2013). Además, parece existir una correlación entre la acumulación de FUS y el nivel de DNA dañado (Qiu et al., 2014). Por otro lado, también se ha mostrado daño en el DNA en motoneuronas de médula espinal de pacientes con expansión repetida *C9orf72* (Walker et al., 2017).

También se han relacionado con ELA mutaciones en genes como *NEK1*, *TAF15*, *SETX* y *EWSR1*, que codifican proteínas implicadas en este proceso de reparación, aunque el papel exacto de su implicación en la ELA y las vías que acontecen no están claras (Hardiman et al., 2017; Izhar et al., 2015).

2.1.6.8. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se produce por un desequilibrio entre la generación de ROS y su eliminación y/o pérdida en la capacidad de la célula de reparar o eliminar el daño inducido por ROS, pudiendo afectar macromoléculas como DNA, proteínas y fosfolípidos y causando daño estructural y cambios en las vías de señalización sensibles a redox (Turner et al., 2013). Su implicación en la patogenia ha sido ampliamente estudiada desde la identificación de mutaciones en el gen *SOD1*, que codifica una de las proteínas antioxidantes más relevantes, asociadas a un 15% de los casos de ELAF (Volk et al., 2018).

en la señalización de astrocitos y microglía (Riancho et al., 2019), evidenciando así la interrelación existente de los mecanismos en el proceso patológico.

2.1.6.9. Neuroinflamación

Durante los últimos años, investigaciones han mostrado nuevos roles del sistema inmune en el desarrollo, homeostasis y envejecimiento del SNC (Chiò et al., 2020). La neuroinflamación es una característica patológica común de muchas enfermedades neurodegenerativas, incluida la ELA (Hooten et al., 2015). Aunque la degeneración y pérdida de motoneuronas es el hallazgo principal, existen evidencias de la activación de una respuesta neuroinflamatoria, en la que los procesos inflamatorios y las células no neuronales podrían tener un papel clave en el daño neuronal y progresión de la enfermedad (Beers & Appel, 2019). En este sentido, estudios *in vitro* con neuronas que expresan mSOD1, no muestran signos patológicos cuando están rodeadas por microglía sana, sin embargo, motoneuronas que carecen de SOD1 desarrollan características patológicas de ELA cuando se rodean de células gliales que expresan mSOD1 (Clement et al., 2003). Aunque esta respuesta inflamatoria se ha considerado un evento secundario e inespecífico a la degeneración, estudios recientes sugieren este proceso como un evento primario debido a la interacción perjudicial entre las motoneuronas dañadas y las células del entorno (Jara et al., 2017). De hecho, se ha demostrado en el ratón transgénico SOD1G93A la existencia de una activación microglial anterior a los primeros signos de muerte neuronal (Hooten et al., 2015).

La respuesta neuroinflamatoria se caracteriza por reactividad de la microglía, astrogliosis, infiltración de linfocitos T y macrófagos periféricos y una superproducción de citoquinas inflamatorias (Beers & Appel, 2019), además de la implicación del sistema del complemento.

Existen evidencias de la naturaleza dual de la inflamación en la ELA tanto en pacientes como en modelos animales (Hooten et al., 2015). La microglía, células inmunes residentes del SNC, además de tomar muestras del entorno y presentar el antígeno, tiene receptores de reconocimiento con patrones como CD14 y receptores tipo Toll (TLR) 2 y 4, que cuando se estimulan dan como resultado una respuesta inmune innata. La microglía tiene un papel altamente dinámico, cambiando su expresión durante el progreso de la enfermedad (Figura 2.8) en función del estímulo y del medio de citoquinas circundante. Las primeras etapas se caracterizan por una microglía con fenotipo neuroprotector (M2) que promueve la reparación y

regeneración tisular mediante la liberación de factores antiinflamatorios y neuroprotectores como IL-4, IL-10, IGF-1 (factor de crecimiento de insulina-1), e interactuar con señales protectoras como CD200 y CX3CL1/fractalquina. Conforme la enfermedad avanza, las motoneuronas dañadas liberan señales que inducen a la microglía a adoptar un fenotipo neurotóxico (M1), caracterizado por un aumento de la producción de ROS y de factores proinflamatorios y neurotóxicos como TNF- α , IL-1, IL-6 y una reducción de factores neurotróficos como el IGF-1 e IL-4, que terminan exacerbando la lesión y acelerando la degeneración (Liu & Wang, 2017). Además, se ha observado que la microglía es compleja y dinámica, pudiendo existir al mismo tiempo distintos efectos y fenotipos (Geloso et al., 2017). El fino equilibrio entre estos fenotipos está altamente influenciado por los linfocitos T reguladores.

Otro tipo celular altamente implicado en la neuroinflamación y degeneración son los astrocitos. En este sentido, estudios con animales mSOD1 han mostrado como el silenciamiento selectivo del gen mSOD1 en astrocitos, o el trasplante de astrocitos sanos, pueden atenuar la toxicidad mediada por astrocitos y la pérdida de motoneuronas, retrasar la progresión de la enfermedad y prolongar la vida de los animales (Haidet-Phillips et al., 2011; Liao et al., 2012; Wang et al., 2011; Yamanaka et al., 2008). Por el contrario, el trasplante de astrocitos que expresan mSOD1 indujo degeneración focal y muerte en la médula espinal de ratas de tipo salvaje (Papadeas et al., 2011). Al igual que la microglía, presentan una dualidad durante el transcurso de la enfermedad, pudiendo ejercer efectos beneficiosos o perjudiciales en función de las señales ambientales (Figura 2.8).

Los astrocitos liberan factor de crecimiento transformador-beta (TGF- β), que suprime la acción neuroprotectora de la microglía y los linfocitos T (Liu & Wang, 2017). Se ha visto tanto en pacientes como en modelos animales de ELA que la ruta metabólica de TGF- β se encuentra más estimulada, lo que lo convierte en un regulador negativo de la respuesta inflamatoria neuroprotectora (Endo et al., 2015). Asimismo, se ha demostrado la capacidad de los astrocitos para desencadenar la muerte de las motoneuronas mediante la activación de un tipo de muerte celular programada llamada necroptosis, que implica la pérdida de la integridad de la membrana plasmática a través de RIPK1 (receptor interacting serine/threonine-protein kinase 1) y MLKL (mixed lineage kinase domain-like) (Re et al., 2014).

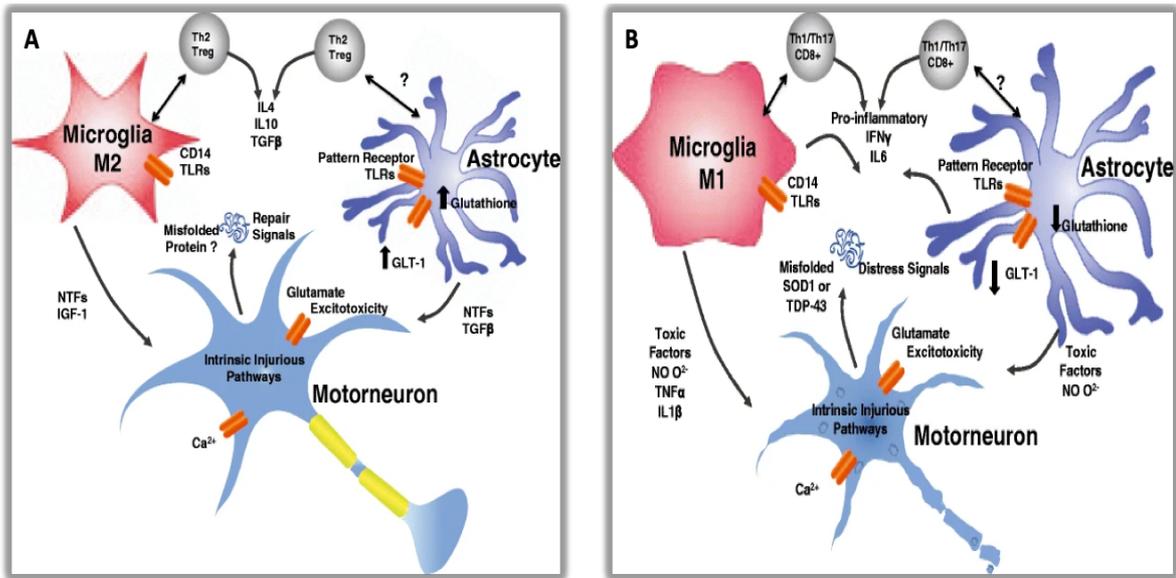


Figura 2.8. Fases neuroprotectora (A) y neurotóxica (B) de la neuroinflamación en la ELA (Hooten et al., 2015).

En la fisiopatología de la ELA no solo intervienen células residentes del SNC sino que también participan linfocitos T y macrófagos circulantes. Se han descrito alteraciones de la barrera hematoencefálica (BHE) tanto en ratones mSOD1 como en pacientes con ELA (Garbuzova-Davis & Sanberg, 2014). Por tanto, una BHE comprometida permitiría la entrada al SNC de linfocitos T y monocitos periféricos que podrían contribuir al proceso neuroinflamatorio. La activación de los macrófagos es dinámica, plástica, rápida y completamente reversible variando a lo largo de un continuo, desde un fenotipo proinflamatorio hasta un fenotipo antiinflamatorio (Malyshev & Malyshev, 2015). Se ha observado una activación de monocitos en sangre de pacientes de ELA en una fase temprana de la enfermedad (Mantovani et al., 2009) asociada a una menor fagocitosis y una desregulación de la secreción de citoquinas proinflamatorias (Zondler et al., 2016, 2017). Asimismo, se ha evidenciado la presencia de monocitos periféricos en médula espinal de animales y pacientes (Butovsky et al., 2012; Zondler et al., 2016).

Los linfocitos T forman parte de la respuesta inmune adaptativa. Distintas poblaciones de linfocitos T son capaces de penetrar en el SNC durante la progresión de la enfermedad, contribuyendo de esta manera al proceso de neuroinflamación que se desencadena en la ELA (Beers & Appel, 2019). En concreto, en muestras de SNC tanto de modelos animales como de pacientes, se encuentran poblaciones de linfocitos T helper (Th) CD4+ asociado a microglía activada en estadios tempranos de la enfermedad, mientras que en etapas finales se observan linfocitos T CD8+ citotóxicos (Hooten et al., 2015). Cada subpoblación de linfocitos tiene

funciones especializadas para controlar las respuestas inmunes. Al igual que microglía y astrocitos, los linfocitos Th CD4+ pueden clasificarse en antiinflamatorios y neuroprotectores (T reguladores (Treg) y linfocitos Th2) o proinflamatorios y neurotóxicos (linfocitos Th1 y Th17) (Hooten et al., 2015).

Se ha observado en sangre, médula espinal y cerebro de afectados de ELA un aumento de los niveles de los linfocitos Th1, Th17 y de las citoquinas que regulan, sugiriendo la implicación de estas células en la patogenia de la ELA (Liu & Wang, 2017). Por otro lado, en el modelo animal SOD1G93A se han encontrado incrementados los linfocitos Treg asociados a una microglía con fenotipo M2 en la etapa inicial de la enfermedad de progresión lenta, mientras que estos disminuyeron junto a los niveles de Foxp3 (forkhead box P3) cuando la progresión fue más rápida (Beers et al., 2011). De la misma forma, en pacientes de ELA se ha visto que el número de Treg se encuentra disminuido en sangre y médula espinal, junto con una reducción de los niveles de FOXP3, TGF- β e IL-4 en las fases de progresión rápida, además, se correlacionaron inversamente los niveles de Treg con el ratio de progresión y severidad de la enfermedad (Beers et al., 2011; Henkel et al., 2013). Un estudio reciente evidenció la deficiencia en la capacidad supresora de los Treg, tanto de afectados con progresión rápida como lenta, y se correlacionó con la progresión de la enfermedad. Además, mostró la capacidad de recuperación de la actividad supresora de los Treg al ser expandidos in vitro (Beers et al., 2017).

Por otro lado, componentes del sistema del complemento se han encontrado elevados en plasma, LCR y médula espinal de pacientes y ratones mSOD1 (Liu & Wang, 2017). La activación del complemento parece que podría agravar la pérdida progresiva de motoneuronas durante el curso de la enfermedad. En particular, el incremento de la señalización de C5aR1-C5a durante la progresión de la ELA sugiere que la vía del complemento contribuye activamente a la patogénesis de la ELA (Kjældgaard et al., 2018).

2.1.6.10. El Inflamasoma NLRP3 en la ELA

Los inflamasomas son complejos multiproteicos localizados principalmente en el SNC, y se encuentran en células inmunes, células neurales, microglía y astrocitos (Guan & Han, 2020). Forman parte integral de la respuesta inmune innata y son responsables de detectar y eliminar los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), así como los patrones moleculares asociados a daños (DAMPs), mediante la secreción de citoquinas proinflamatorias. En los últimos años, estos sensores intracelulares han cobrado relevancia debido a su potencial papel en la procesos inmunes e inflamatorios, pudiendo contribuir a la lesión neuronal y muerte celular (Voet et al., 2019).

De los diferentes tipos de inflamasomas existentes, el mejor caracterizado y más estudiado es el inflamasoma NLRP3 (nod-like receptor family pyrin domain containing 3). El nivel celular de NLRP3 suele ser bajo y, para alcanzar el umbral crítico para inducir la activación de caspasa-1 (CASP1), es necesaria la activación canónica del inflamasoma NLRP3 que se produce en dos pasos (Figura 2.9). El primer paso es de preparación y está mediado por moléculas que se unen a TLR o citoquinas endógenas que, a través de la vía NF- κ B (nuclear factor-kappa B), inducen una regulación transcripcional, aumentando la transcripción de NLRP3, pro-IL-1 β y pro IL-18. En un segundo paso, se induce la oligomerización y activación del inflamasoma. NLRP3 se une a la proteína adaptadora ASC (apoptosis-associated speck-like protein, también conocida como PYCARD) e induce la activación de la CASP1 que a su vez promueve la maduración y secreción de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β y IL-18, las cuales estimulan finalmente la inflamación y la respuesta inmune innata (Gugliandolo et al., 2018). Además, la activación de CASP1 también induce una forma de muerte celular inflamatoria conocida como piroptosis, que se caracteriza por la ruptura rápida de la membrana plasmática, la fragmentación del DNA y la liberación del contenido citosólico proinflamatorio al espacio extracelular (Guan & Han, 2020).

Se ha relacionado el inflamasoma NLRP3 con la patogenia de la ELA. Varios estudios han corroborado una activación del inflamasoma en cerebro, tálamo anterior y médula espinal de diferentes modelos animales de ELA (Bellezza et al., 2018a; Debye et al., 2018; Gugliandolo et al., 2018; Johann et al., 2015), además de una activación en astrocitos de pacientes (Johann et al., 2015). Asimismo, se ha demostrado como los agregados proteicos de TDP-43 pueden inducir la activación de la microglía y desencadenar la activación del inflamasoma (Zhao et al., 2015).

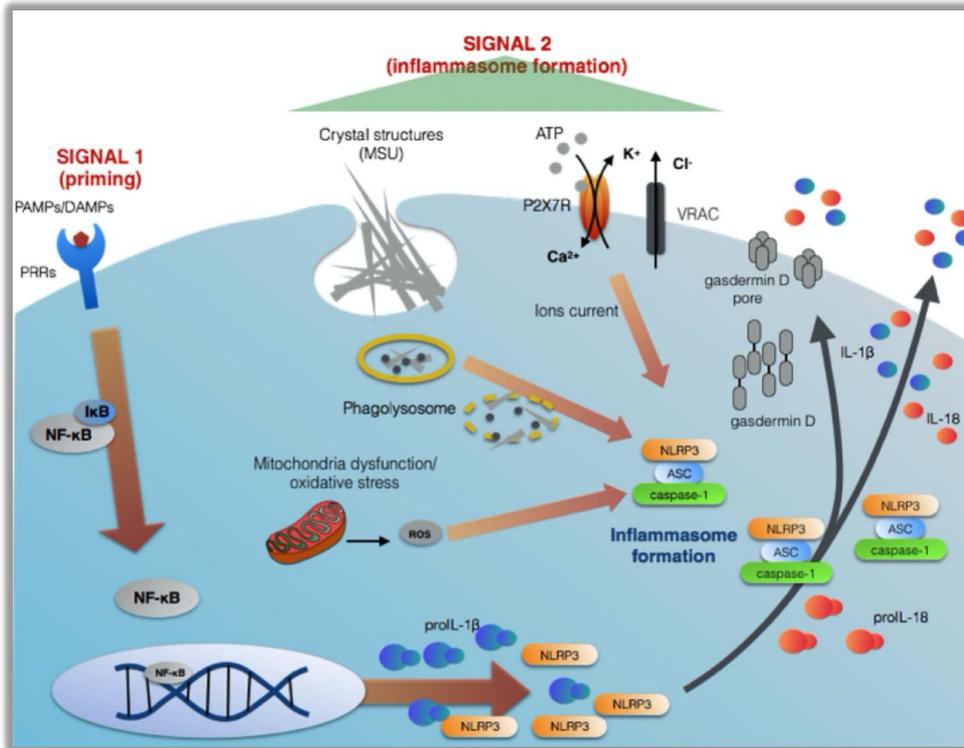


Figura 2.9. Representación esquemática de la formación de NLRP3 (Marchetti, 2019).

2.1.6.11. MicroRNAs en la ELA

Desde su descubrimiento hace más de 25 años (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993), los miRNAs han ido cobrando relevancia debido a su capacidad para regular la expresión génica y su participación en multitud de procesos tanto fisiológicos como patológicos (Jin et al., 2013; O'Connell et al., 2010; Sayed & Abdellatif, 2011).

Los miRNAs son pequeñas moléculas de RNA no codificantes endógenas de 17 a 22 nucleótidos de longitud que regulan la expresión génica mediante mecanismos de silenciamiento post-transcripcional dependientes de RNA (Krol et al., 2010). Se unen al 3'-UTR, la región no traducida de su mRNA diana, provocando la regulación de este, ya sea a través de su desestabilización o inhibición de la traducción de proteínas (Huntzinger & Izaurralde, 2011). Además, un solo miRNA a menudo puede unirse a varios cientos de mRNA, mientras que varios miRNAs diferentes pueden unirse al mismo mRNA (Shin et al., 2010).

El proceso de biogénesis de miRNAs (Figura 2.10) es un proceso escalonado estrictamente regulado por procesos enzimáticos específicos (Rinchetti et al., 2018). Los miRNAs se transcriben a partir de genes específicos o de los intrones de genes que codifican proteínas (Krol et al., 2010). Comienza en el núcleo celular con la transcripción por la ARN polimerasa II, dando lugar a transcripciones primarias (pri-miRNA), encapsuladas y poliadeniladas, con una estructura de tallo y bucle de unos 80 nt. Estos transcritos son procesados por el microprocesador, complejo multiproteico formado por proteínas Drosha y DGCR8, generando un miRNA precursor en forma de horquilla de 70 nt de longitud (pre-miRNA). Posteriormente, el pre-miRNA se transloca al citoplasma por la exportina 5 a través del complejo de poros nucleares en un proceso dependiente de Ran-GTP. A continuación, el pre-miRNA se libera en el citosol, donde es escindido por la endonucleasa Dicer para producir un dúplex intermedio de miRNA maduro de 20 bases. Dependiendo de la secuencia específica de miRNA, una de las hebras de este dúplex se carga en una proteína argonauta (AGO) para formar el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC), mientras que la otra hebra (hebra pasajera), suele liberarse y degradarse. Finalmente, el RISC cargado de miRNA guía el complejo enzimático hacia el mRNA diana basándose en la secuencia de complementariedad para la región 3'-UTR. De hecho, el grado de complementariedad del miRNA-mRNA determina el destino del mRNA diana: un apareamiento perfecto conduce a la degradación de la transcripción, mientras que un emparejamiento de bases incompleto se asocia con represión traduccional, degradación del mRNA o secuestro en estructuras citoplasmáticas llamadas cuerpos- P (Paez-Colasante et al., 2015; Rinchetti et al., 2018).

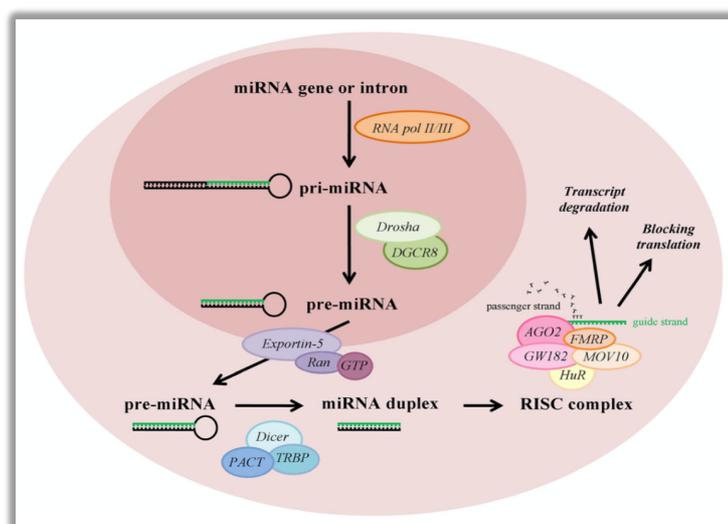


Figura 2.10. Proceso de biogénesis de miRNAs (Rinchetti et al., 2018).

La importancia de los miRNAs en la ELA se puso de manifiesto al observar distintos perfiles diferenciales de miRNAs en sangre y LCR de pacientes tanto con ELAE como ELAF en comparación con controles sanos, sugiriendo así su posible implicación en la patogenia de la ELA (De Felice et al., 2012; Freischmidt et al., 2014). De hecho, varios miRNAs asociados con el mantenimiento del sistema nervioso y las vías de muerte celular están desregulados en médula espinal de pacientes (Campos-Melo et al., 2013; Figueroa-Romero et al., 2016) así como en el modelo SOD1G93A (Butovsky et al., 2012; Hoye et al., 2017).

La capacidad de los miRNAs para mejorar o restringir la señalización inflamatoria dentro del SNC es un área de investigación en auge. El aumento de la información sobre las funciones reguladoras de los miRNAs y el descubrimiento de RNA endógenos competidores (ceRNA), incluidos RNA largos no codificantes, RNA circulares y pseudogenes, han puesto de manifiesto la complejidad de la regulación génica mediada por miRNAs, con un cambio de paradigma de una regulación unidireccional a una bidireccional, donde el miRNA actúa como regulador y está regulado por ceRNA (Nuzziello & Liguori, 2019; Su et al., 2016), formando una compleja maquinaria reguladora de intercomunicación, que se conoce como red ceRNA (ceRNET).

Caracterizar la biogénesis de los miRNAs e investigar los posibles mecanismos que subyacen a su desregulación podría ser una herramienta prometedora para comprender su participación en la patogénesis de la ELA, desarrollar futuros enfoques terapéuticos (Rinchetti et al., 2018) así como para desarrollar nuevos biomarcadores diagnóstico y pronóstico, ya que poseen alta especificidad, estabilidad y pueden detectarse en fluidos biológicos donde muestran el perfil de expresión de las células originales, incluidas las neuronas (Ravnik-Glavač & Glavač, 2020).

2.2. Modelos experimentales en ELA

El objetivo y deseo de toda persona que conozca la Esclerosis Lateral Amiotrófica es el hallazgo de una cura, pero actualmente no es posible ya que la causa es desconocida. Por tanto, los objetivos actuales en el tratamiento de la enfermedad consisten en intentar retrasar la progresión de la enfermedad y mejorar la calidad de vida de los afectados. Actualmente, es muy complejo y poco factible estudiar en pacientes procesos patológicos celulares a tiempo real, ni extraer de forma seriada muestras de tejido que, a excepción de la sangre, suelen ser *post mortem*. Esto implica la imposibilidad de estudiar los procesos que acontecen en la ELA en

estadios tempranos o sintomáticos e incluso no poder estudiar la variación durante la progresión de la enfermedad de algún parámetro que interese en los pacientes. Todo lo anterior, sumado a la gran heterogeneidad de la ELA tanto en edad de inicio, sintomatología y progresión y, a la existencia de factores modificadores de la enfermedad, hacen un desafío el estudio en pacientes. Por tanto, para comprender mejor los mecanismos que conducen a la degeneración y muerte de las motoneuronas, identificar posibles dianas terapéuticas y posibles terapias efectivas es necesario el desarrollo de modelos de ELA más sencillos y accesibles.

El descubrimiento de la primera mutación génica asociada a ELA (Rosen et al., 1993) posibilitó la creación del primer modelo murino de la enfermedad, el ratón transgénico SOD1G93A (Gurney et al., 1994). Desde entonces y gracias al número creciente de genes identificados relacionados con la ELA, han favorecido el desarrollo de diversos modelos experimentales como sistemas bioquímicos *in vitro*, cultivos celulares, invertebrados, vertebrados no mamíferos, roedores, y células madre derivadas de pacientes que proporcionan una mejor comprensión de la enfermedad. Cada modelo tiene sus ventajas e inconvenientes (Figura 2.11); normalmente están asociados al grado de evolución, posibilidad y dificultad de manipulación y a la complejidad del SNC que poseen (Lambrechts et al., 2017).

Aunque no existe el modelo experimental perfecto que refleje o mimetice exactamente la patología humana, son una pieza clave en la investigación del origen, fisiopatología y comprensión de los mecanismos moleculares subyacentes, identificación de posibles dianas terapéuticas y evaluación de ensayos de potenciales agentes terapéuticos.

| |  Levadura |  C. elegans |  Drosophila |  Pez cebra |  Modelos roedores |  PSC, iNeuronas |
|-------------------------------------|--|--|--|---|--|--|
| Ciclo vital | Rápido | Rápido | Rápido | Intermedio | Lento | - |
| Esperanza de vida | Corta | Corta | Corta | Larga | Larga | - |
| Homología génica con humanos | 30% | 35% | 75% | >90% | 100% | 100% |
| Conservación de proteínas | 26% | 35% | 40% | 75% | 85% | 100% |
| Screening genético | Sí | Sí | Sí | Sí | No | En un futuro |
| Rendimiento | Alto | Alto | Intermedio | Intermedio | Bajo | Intermedio |
| Costes | Bajo | Bajo | Bajo | Intermedio | Alto | Alto |

Figura 2.11. Principales modelos en la investigación en ELA (modificado de Van Damme et al., 2017).

A continuación, se explican brevemente los diferentes modelos experimentales existentes actualmente para la ELA.

2.2.1. Modelos celulares

Aunque no reflejan la complejidad de la enfermedad que se produce en humanos, estos modelos resultan una buena herramienta en la investigación molecular del papel que desempeñan los genes y proteínas asociadas a ELA (Van Damme et al., 2017).

2.2.1.1.-*Saccharomyces cerevisiae*

Esta levadura fue el primer eucariota en tener su genoma totalmente secuenciado (Goffeau et al., 1996). Es un modelo muy empleado en el estudio de enfermedades neurodegenerativas ya que algunos procesos están altamente conservados con los humanos, como los involucrados en el plegamiento de proteínas y las vías de respuestas al estrés (Di Gregorio & Duennwald, 2018); además, también resulta útil para estudiar la teoría de propagación “prion-like” intracelular (Monahan et al., 2018) y la citotoxicidad inducida por proteínas (Lindström & Liu, 2018). Hay varios modelos de levaduras publicados y de todos ellos, los mejor desarrollados son para los genes *TDP-43*, *FUS* y *SOD1* (Lindström & Liu, 2018). Algunas de las aportaciones más importantes al conocimiento de la ELA han sido la identificación de la proteína ATXN2 como un modificador de la toxicidad de TDP-43, hecho que luego fue confirmado en otros modelos (Rencus-Lazar et al., 2019). También se ha demostrado que la toxicidad de SOD1 se correlaciona con un mecanismo de ganancia de función tóxica que implica la pérdida de la estabilidad de la proteína (Bastow et al., 2016).

Entre las ventajas de este modelo se encuentran unas condiciones de cultivo rápidas y económicas, manipulación genética relativamente sencilla y la posibilidad de una detección de alto rendimiento ya que existen un amplio número de bibliotecas genéticas (Kryndushkin & Shewmaker, 2011). Por el contrario, la inexistencia de neurofilamentos y de la compleja interacción existente entre las motoneuronas y su ambiente supone una limitación importante. Por ello, antes de decidir trabajar con levaduras se debe tener en cuenta que no es posible estudiar algunos de los mecanismos que intervienen en la patogenia de la ELA como ciertos procesos del metabolismo del RNA, comunicación intercelular, transporte axonal y neuroinflamación (Di Gregorio & Duennwald, 2018).

A pesar de las limitaciones, se considera una buena herramienta para estudiar mecanismos celulares básicos y poner a prueba posibles dianas terapéuticas que, en caso de obtener resultados positivos, luego deben ser confirmadas en organismos superiores.

2.2.1.2.- Modelos celulares de ratón

Esta clase de modelos *in vitro* son empleados con frecuencia en investigación e incluyen diversos tipos como cultivos de neuronas motoras aisladas, cultivos organotípicos, la línea celular NSC-34 (línea híbrida de médula espinal de ratón embrionario enriquecidas en motoneuronas fusionada con células de neuroblastoma) y la línea celular de mioblastos C2C12. El potencial de estos modelos radica en la gran variedad de posibilidades de estudio que presentan, como por ejemplo, estudio de la función de genes y proteínas relacionados con ELA, estudios proteómicos, bioquímicos, toxicidad relacionada con la sobreexpresión de proteínas mutantes o de tipo salvaje, estudios de vulnerabilidad neuronal e identificación de genes o compuestos modificadores de la enfermedad en estudios no sesgados (Van Damme et al., 2017). Dichos estudios han demostrado, por ejemplo, la importancia de los dominios de baja complejidad en las proteínas relacionadas con ELA para la formación de gránulos de estrés (Molliex et al., 2015) y el papel de *C9orf72* en la autofagia (Webster et al., 2016).

Estos modelos tienen ciertas ventajas con respecto a los *in vivo* como un ambiente controlado, mecanismos celulares o tisulares individuales, manipulaciones genéticas relativamente sencillas y fácil cultivo. Sin embargo, presentan algunas desventajas como posibilidad de contaminación y no recapitular la complejidad de la enfermedad humana. A pesar de la utilidad de estos modelos *in vitro*, la compleja etiopatogenia de la ELA, con distintos sistemas involucrados en su desencadenamiento y progresión, hace indispensable el uso de modelos *in vivo*.

2.2.1.3. Células Madre Pluripotenciales Inducidas

Este nuevo enfoque ha supuesto toda una revolución en el campo de la investigación, ya que a partir de células adultas se pueden generar células madre pluripotentes inducidas (induced pluripotent stem cells, o iPSCs) (Takahashi et al., 2007), que pueden ser diferenciadas a neuronas y diferentes tipos celulares, abriendo un interesante camino en la investigación del papel de cada tipo celular en la patogénesis y en la interacción entre los tipos celulares (Guo et al., 2017), lo que podría aportar importantes nuevos conocimientos sobre la enfermedad.

Aunque la tecnología es laboriosa y complicada, las iPSCs presentan ciertas ventajas ya que, al derivar directamente de células de afectados de ELA, posibilitan la creación de modelos sin la necesidad de expresión de un transgén con la mutación causal además de permitir el estudio tanto de ELAF como ELAE, algo que hasta ahora no era posible en el caso de la ELAE. Además, se pueden crear controles isogénicos con el mismo fondo genético que el paciente mediante la tecnología de edición de genes como CRISPR / Cas9 (Van Damme et al., 2017).

Como todo modelo, también tiene sus inconvenientes. Suelen mostrar escasa eficiencia, posibilidad de mutagénesis insercional y de reprogramación incompleta, sin obviar el alto coste que supone comparado con otros modelos existentes (Guo et al., 2017; Hawrot et al., 2020). A pesar de los inconvenientes y, aunque es necesario perfeccionar la investigación, las iPSCs abren un nuevo campo en la búsqueda de potenciales dianas terapéuticas, haciendo factible la creación en un futuro de una terapia personalizada, algo muy importante si se tiene en cuenta la gran heterogeneidad de la enfermedad. Aun así, sigue siendo necesaria la validación en otros modelos *in vivo*.

2.2.2.-Modelos animales

Como se ha comentado anteriormente, la gran limitación de los modelos celulares es la inexistencia de las interacciones que suceden entre las motoneuronas y otros tejidos afectados con su entorno, interacciones que pueden ser clave para el desarrollo y progresión de la enfermedad. Para solventar este problema y, gracias a los avances técnicos en edición génica, se han ido desarrollando diferentes modelos animales, tanto invertebrados como vertebrados, que proporcionan la posibilidad de explorar los mecanismos de la enfermedad e incluso los efectos de un tratamiento potencial en un organismo vivo de una manera más realista. A continuación, se hace una breve descripción de los modelos animales actualmente existentes.

2.2.2.1.-*Caenorhabditis elegans*

Este nematodo de 1 mm de longitud se emplea con frecuencia en estudios de plegamiento proteico de enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, Ataxias y ELA (Li & Le, 2013). Su genoma está secuenciado desde 1998 y está extremadamente bien caracterizado. A pesar de tener un sistema nervioso relativamente simple con 302 neuronas, sirve como un buen modelo para estudios de toxicidad neuronal e interacciones génicas ya que su manipulación genética es sencilla y, al tener una vida media corta (2-3 semanas), se pueden

obtener en poco tiempo múltiples mutantes con diferentes fenotipos (Therrien & Parker, 2014). Una de las características más interesantes es su transparencia ya que permite la visualización de todos los tipos celulares en todas las etapas de desarrollo, pudiéndose detectar y cuantificar la muerte neuronal y las inclusiones de proteínas mediante técnicas ópticas (Berthod & Gros-Louis, 2012).

Se han desarrollado modelos transgénicos de los principales genes implicados en la ELA como *SOD1*, *TDP-43*, *FUS*, *C9orf72* (Li & Le, 2013), que han contribuido a conocimientos importantes sobre la patología, como el papel de la calcineurina en la fosforilación patológica de TDP-43 (Liachko et al., 2016) o el potencial papel de dinactina-1 para el transporte de autofagosomas (Ikenaka et al., 2013).

Sin embargo, esta misma simplicidad celular y molecular supone un inconveniente ya que no representa fielmente la fisiopatología en humanos, aun así, resulta un buen modelo para profundizar en los mecanismos neurotóxicos que suceden y en la alteración del metabolismo del RNA, formación de gránulos de estrés y en el cribado de fármacos y drogas.

2.2.2.2.-*Drosophila melanogaster*

Más conocida como la mosca de la fruta, es uno de los modelos genéticos eucariotas multicelulares más antiguos. Es el modelo animal invertebrado más utilizado en ELA por sus múltiples ventajas ya que posee ortólogos para aproximadamente un 75% de los genes humanos con aproximadamente un 40% de homología (Van Damme et al., 2017). Además, tiene condiciones de cultivo sencillas, económicas, vida media de aproximadamente 50 días y un ciclo reproductivo corto que permite obtener un alto número de descendencia genéticamente idéntica (Lambrechts et al., 2017). Una de las características más importantes es el complejo sistema nervioso que posee con cerca de 100.000 neuronas y la existencia de numerosas herramientas genéticas (Ugur et al., 2016).

Numerosos genes relacionados con ELA tienen su modelo transgénico como *SOD1*, *FUS*, *TARDBP*, *C9orf72*, *VAPB*, *VCP*, *SETX* (Van Damme et al., 2017). Son múltiples las aportaciones de estos modelos; por ejemplo, evidencias de toxicidad tanto por deficiencia como por sobreexpresión en modelos de *TARDBP* y *FUS* (Lanson Jr et al., 2011; Vanden Broeck et al., 2013) y la confirmación de *ATXN2* como modificador de la toxicidad de *TDP-43* (Elden et al., 2010).

2.2.2.3.-*Danio rerio*

El pez cebra es cada vez más empleado en investigación debido a la alta conservación de genes implicados en enfermedades neurodegenerativas y procesos fisiológicos involucrados en la morfogénesis y el mantenimiento del sistema nervioso (Babin et al., 2014). Su genoma secuenciado (Howe et al., 2013) propició el uso generalizado de morfolidos (Nasevicius & Ekker, 2000), oligonucleótidos antisentido diseñados para regular temporalmente la función de un gen, permitiendo así la realización de pantallas genéticas directas e inversas (Phillips & Westerfield, 2014). Además de esta ventaja metodológica, otras ventajas a considerar son una alta fecundidad, desarrollo rápido, transparencia de larvas y embriones y manipulación genética más sencilla que en otros vertebrados debido a su fertilización externa. Es un potente modelo para la detección de alto rendimiento de moléculas o toxinas modificadoras de la patogénesis (Morrice et al., 2018) y para el estudio de interacciones génicas (Babin et al., 2014). Una de las limitaciones a considerar de este modelo son las diferencias neuroanatómicas con mamíferos, como la inexistencia de motoneuronas superiores (Babin et al., 2014).

Se han desarrollado desde líneas knock-out hasta transgénicos de los principales genes asociados a ELA que han proporcionado avances importantes en la investigación sobre la enfermedad. Por ejemplo, *SOD1* mutante produce toxicidad neuronal por una ganancia de función (Sakowski et al., 2012), mecanismos combinados de ganancia y pérdida de función para *TARDBP*, *FUS* y *C9orf72* (Van Damme et al., 2017), el factor neurotrófico progranulina reduce la toxicidad inducida por *TDP-43* y *FUS*, pero no por *SOD1* (Kabashi et al., 2011; Laird et al., 2010).

2.2.2.4. Modelos roedores

Los modelos roedores son los más numerosos y empleados en la investigación de enfermedades biomédicas en general. Los avances en técnicas de ingeniería genética han permitido la creación de una gran variedad de modelos modificados genéticamente como transgénicos, knock-out, knock-in, cepas que contienen reordenamientos cromosómicos, hasta modelos creados mediante técnicas de edición de genes como CRISPR/Cas9.

La ELA es principalmente de herencia autosómica dominante por lo que la mayoría de los modelos existentes son líneas transgénicas en las que se ha insertado aleatoriamente un gen humano mutado en el genoma del animal. Es un método rápido para producir nuevas cepas y como es de carácter dominante, el fenotipo se expresa a pesar de la presencia de los genes ortólogos de ratón (De Giorgio et al., 2019). Son los modelos más empleados en la ELA ya que

proporcionan un entorno *in vivo* complejo de tejidos e interacciones célula-célula, que son fundamentales para el estudio de enfermedades neurodegenerativas complejas, como la ELA, en las que las interacciones entre la glía, las motoneuronas y el músculo son probablemente necesarias para el desarrollo de la enfermedad. Asimismo, además de posibilitar la investigación en cultivos celulares *in vitro*, obtenidos a partir de estos modelos, permiten validar los hallazgos encontrados en modelos experimentales inferiores, profundizar en los mecanismos subyacentes y en la realización de ensayos preclínicos de posibles agentes terapéuticos.

2.2.2.4.1. *Mus Musculus*

Los modelos de ratón son los más empleados tanto en investigación básica como en estudios preclínicos ya que, a pesar de las diferencias que existen con los humanos, poseen un 99% de homología génica (Waterston et al., 2002) y los mecanismos bioquímicos están ampliamente conservados (Nair et al., 2019).

Los primeros modelos identificados, caracterizados y empleados en la investigación de la ELA fueron tres modelos portadores de mutaciones espontáneas, el ratón pmn con neuropatía progresiva (Schmalbruch et al., 1991), el ratón nmd con degeneración neuromuscular (Cook et al., 1995) y el ratón wobbler (Mitsumoto & Bradley, 1982). Estos animales fueron considerados modelos naturales de ELA debido a que muestran un fenotipo caracterizado por una debilidad progresiva de las extremidades anteriores y/o posteriores que conduce a una parálisis e incluso una degeneración neuronal en médula espinal y corteza motora. Sin embargo, el curso temporal y la patología difieren bastante a lo observado en afectados de ELA por lo que los resultados obtenidos en estos modelos revisten cierta dificultad y poca confianza. Por tanto, la generación de modelos modificados genéticamente supuso finalmente un gran avance en este sentido. Existen numerosos modelos de la enfermedad que portan distintas mutaciones, reflejo de la gran heterogeneidad y complejidad de la ELA.

2.2.2.4.1.1. Modelos SOD1

Como se ha comentado anteriormente, el descubrimiento de la primera mutación génica asociada a ELA (Rosen et al., 1993) propició la creación del primer modelo murino de ELA, el ratón SOD1G93A [Tg (SOD1*G93A)1Gur]. Se trata de un ratón transgénico portador del gen humano *SOD1* mutado en el que hay una conversión de Glicina a Alanina en el codón 93 (Gurney et al., 1994). Además, la SOD1 mutada se expresa en todos los tipos celulares, no solo en las

neuronas, y es altamente dependiente del número de copias del transgén, ya que una reducción en el número de copias se correlaciona con la supervivencia del animal (Alexander et al., 2004).

Los ratones SOD1G93A desarrollan una neurodegeneración rápida y progresiva que produce una parálisis de las patas traseras y conduce a la muerte alrededor de los 4-5 meses de edad (Figura 2.12) (B. J. Turner & Talbot, 2008).

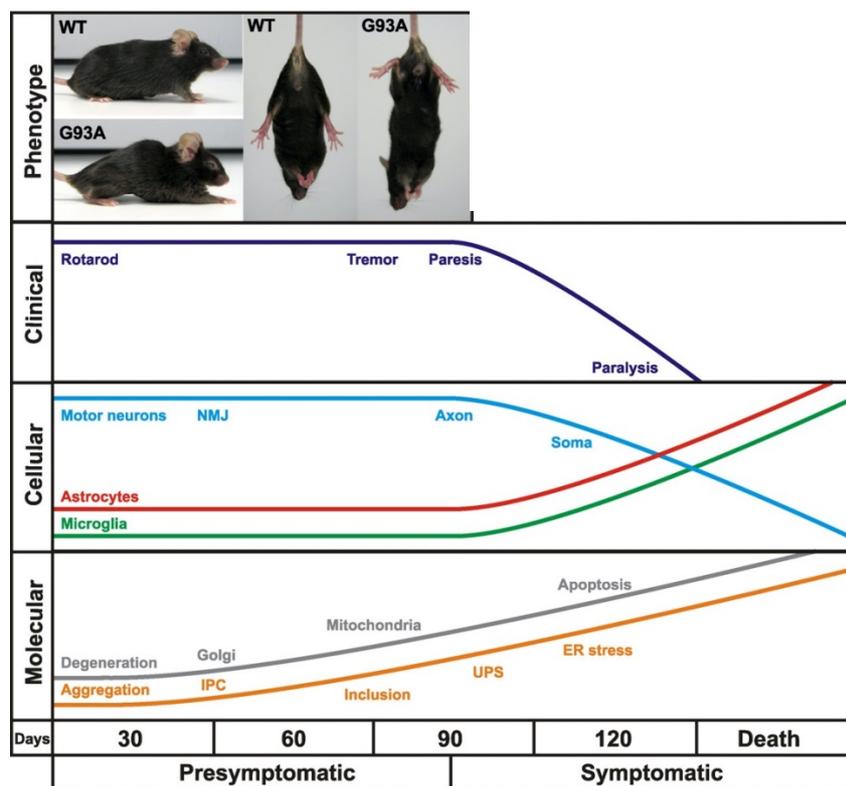


Figura 2.12. Aspectos clínicos y neuropatológicos descritos en el modelo SOD1G93A de alta copia (B. J. Turner & Talbot, 2008).

Desde este primer modelo SOD1G93A, se han desarrollado numerosos modelos que sobreexpresan tanto la forma salvaje como diferentes mutaciones encontradas en pacientes (De Giorgio et al., 2019). La mayoría de estas líneas transgénicas utilizan el promotor de *SOD1* pero también se han desarrollado modelos que utilizan promotores astrocíticos o específicos neuronales (Picher-Martel et al., 2016).

Aunque cada línea difiere en el inicio, presentación, tasa de progresión y supervivencia, la mayoría presentan unas características comunes como astrogliosis y microgliosis de inicio temprano, excitotoxicidad mediada por glutamato, déficits de transporte axonal, vacuolización mitocondrial, procesamiento aberrante de neurofilamentos y un aporte metabólico reducido a las motoneuronas por las células gliales circundantes (Philips & Rothstein, 2015). Todos estos

mecanismos patogénicos conducen a una pérdida de neuronas motoras espinales, denervación axonal, atrofia muscular, parálisis progresiva, agregación proteica y esperanza de vida corta (Lutz, 2018). Es importante resaltar que la heterogeneidad de los fenotipos no solo depende de la mutación específica en el gen sino también del fondo genético de la cepa, el nivel de sobreexpresión del transgén (dependiente del número de copias) y el sexo del animal (Alexander et al., 2004; Mancuso et al., 2012; Oliván, Calvo, et al., 2014; Pfohl et al., 2015).

Durante los últimos veinte años, los modelos *SOD1*, principalmente el modelo SOD1G93A, han sido fundamentales para comprender los efectos de la proteína SOD1 mutante y han formado la base de gran parte del conocimiento de la fisiopatología subyacente a la ELA (McGoldrick et al., 2013) como toxicidad de glutamato, alteración mitocondrial y del transporte axonal, plegamiento proteico aberrante y otras alteraciones celulares relacionadas con la enfermedad (Lutz, 2018). Gracias a estos modelos se sabe que la ELA no es una enfermedad con autonomía celular sino que las células no neuronales son clave en el desarrollo de la enfermedad (Philips & Rothstein, 2015). Para comprender la contribución de poblaciones celulares específicas a la patogénesis, se han generado modelos que expresan selectivamente la SOD1 mutante en subpoblaciones gliales y neuronales específicas; estos modelos no inducen el fenotipo de la enfermedad como en los animales transgénicos mutantes ubicuos, lo que indica que la expresión de SOD1 mutante en motoneuronas y glía es necesaria para el desarrollo de la enfermedad (Philips & Rothstein, 2015). Otra aportación muy importante ha sido esclarecer el papel de la proteína en la patología; la creación del ratón knock-out de *SOD1*, modelo de estrés oxidativo crónico debido a la eliminación sistémica de SOD1, ayudó a descartar la hipótesis de pérdida de función dismutasa como causa de ELA ya que este modelo, a pesar de mostrar una denervación severa y progresiva de los músculos de las extremidades posteriores, no desarrolla degeneración de las motoneuronas a ninguna edad (Fischer et al., 2012).

Sin embargo, a pesar de ser considerada la sobreexpresión como una limitación, la correlación significativa entre el nivel de expresión y la gravedad de la degeneración ha resultado útil para el desarrollo de estrategias de silenciamiento génico utilizando oligonucleótidos antisentido (ASO) para tratar la ELA mediada por SOD1 mutante (Smith et al., 2006; van Zundert & Brown, 2017).

Es importante mencionar que la degeneración neuronal motora cortical, característica de la ELA humana, no se produce en la mayoría de estas líneas; considerándose por tanto un modelo de motoneurona inferior. Aun así, son los mejor caracterizados para estudiar la enfermedad *in vivo*. El modelo SOD1G93A debido a su inicio temprano, rápida progresión y pérdida progresiva de motoneuronas, desarrolla un fenotipo y características patológicas

similares a los humanos y es considerado el modelo más robusto, siendo el más empleado tanto en investigación básica como en ensayos preclínicos.

2.2.2.4.1.2. Modelos TDP-43

La presencia de la proteína TDP-43 como el principal componente patológico de las inclusiones citoplasmáticas de motoneuronas de pacientes con ELA y DFT junto con la asociación de mutaciones en el gen *TARDBP* a casos de ELAE y ELAF, originaron el desarrollado de modelos animales que son empleados sobre todo en el estudio de los mecanismos relacionados con el procesamiento de RNA, respuesta de gránulos de estrés y génesis de miRNAs (Stephenson & Amor, 2017).

La creación del transgénico que sobreexpresa TDP-43 mutante no fue sencilla debido a la alta mortalidad existente en estadios tempranos. Esta mortalidad se relacionó con el nivel de expresión del transgén y la gran toxicidad de la TDP-43 mutante (Hatzipetros et al., 2014). Actualmente existen numerosas líneas que expresan diferentes fenotipos en función de la mutación portada por el gen humano, nivel de expresión del transgén y promotor usado (Lutz, 2018). Los promotores más utilizados son mPrp (promotor prión de ratón) que induce una alta expresión en todo el SNC y el tejido cardíaco con una menor expresión en hígado y riñón (Philips & Rothstein, 2015), el promotor Thy-1.2 que induce expresión en casi todas las neuronas y el promotor CaMKII que induce expresión en el prosencéfalo (Joyce et al., 2011.).

Estos modelos TDP-43 muestran fenotipos variables, citotoxicidad dependiente de la dosis, y desarrollan principalmente alteraciones axonales con degeneración leve de motoneurona sin reproducir completamente un fenotipo de ELA (Mancuso & Navarro, 2015). Además, se ha demostrado que la sobreexpresión de TDP-43 humano no mutada causa una neurodegeneración significativa (McGoldrick et al., 2013). Debido al espectro continuo existente entre ELA y DFT, existen líneas que portan mayoritariamente un fenotipo u otro. Es importante elegir el modelo que mejor represente aquello que se quiere evaluar para evitar errores de interpretación, ya que las pruebas cognitivas pueden estar influenciadas por el déficit motor (Stephenson & Amor, 2017).

El modelo más reciente de TDP-43 ha sido creado mediante tecnología CRISPR/Cas9 (White et al., 2018) pero, a pesar de conseguir eliminar la sobreexpresión del transgén, no posee un fenotipo robusto ni expresa la patología típica TDP-43. El modelo más relevante que tal vez represente más fielmente el fenotipo y patología TDP-43 es el ratón transgénico Prp-hTDP-

43A315T (Wegorzewska et al., 2009) que muestra agregados patológicos de proteínas ubiquitinadas en poblaciones neuronales específicas, además de mostrar una neurodegeneración progresiva que recuerda tanto a la ELA como a la DFT, aunque también posee problemas gastrointestinales que se intenta solventar con una dieta modificada (Coughlan et al., 2016; Herdewyn et al., 2014).

2.2.2.4.1.3. Modelos FUS

La creación de modelos con mutaciones en *FUS* han ayudado a comprender los mecanismos por los cuales las mutaciones en esta proteína causan ELA y por qué alteraciones en el metabolismo del RNA pueden conducir a una neurodegeneración. Se han desarrollado diversas líneas que incluyen knock-out, knock-in y sobreexpresión de proteína FUS tanto de tipo salvaje como mutada, la mayoría de los cuales interrumpen la señal de localización nuclear (Lutz, 2018). Al igual que el modelo TDP-43, una sobreexpresión de FUS salvaje causa patología FUS y fenotipo clínico. Además, líneas knock-out no muestran fenotipo motor de neurodegeneración, lo que sugiere que la pérdida de FUS por sí sola es insuficiente para causar patología de ELA (Nolan et al., 2016).

La reproducción tanto del fenotipo de disfunción motora como de las características neuropatológicas distintivas de la ELA ligada a *FUS* ha demostrado ser un gran desafío; si bien los modelos proporcionan pistas sobre el papel patomecánico de *FUS* y su importancia en neurodegeneración, ninguno recapitula completamente las características de la ELA humana (Nolan et al., 2016). Los diferentes modelos expresan diversos fenotipos que van desde manifestaciones motoras puras con denervación muscular, axonopatía y degeneración espinal de motoneurona hasta déficits cognitivos puros con deterioro de la memoria y muerte de las neuronas del hipocampo (Mancuso & Navarro, 2015). Asimismo, los modelos que sobreexpresan FUS muestran fenotipos severos y agresivos (Lutz, 2018).

El modelo que mejor representa la ELA-DFTL asociada a *FUS* tal vez sea la línea FUS [1-359]-tg ya que recapitula varias características principales de la ELA como neuroinflamación, neurodegeneración, atrofia muscular y parálisis (Shelkownikova et al., 2013) así como signos patomorfológicos cerebrales y cambios cognitivos y conductuales característicos de DFT (de Munter et al., 2020).

2.2.2.4.1.4. Modelos C9ORF72

Los últimos modelos desarrollados han sido los que modifican el gen *C9ORF72* debido a que ha sido uno de los últimos genes mayoritarios relacionados con la enfermedad. Los mecanismos vinculados a la patogénesis de *C9ORF72* no están claros y existen varias hipótesis al respecto como pérdida de función, toxicidad del RNA y acumulación tóxica de proteínas repetidas sentido y antisentido en forma de repeticiones dipéptido (DPR) (Gitler & Tsuiji, 2016). Aunque se han desarrollado modelos representativos de los diferentes mecanismos propuestos, la mayoría no posee un fenotipo identificable a pesar de mostrar signos de patología (Stephenson & Amor, 2017). Para imitar la enfermedad humana, los modelos de ratón *C9ORF72* de ELA portarían idealmente proteinopatía TDP-43, focos sentido y antisentido DPR, pérdida / degeneración de neuronas motoras, déficits metabólicos, gliosis, debilidad y signos cognitivos de FTD (Stephenson & Amor, 2017). Actualmente, el modelo h(G4C2)₃₇₋₅₀₀ (Chew et al., 2015) tal vez sea el que mejor represente la patología y manifieste el fenotipo.

Asimismo, también se emplean como modelos preclínicos para nuevas terapias emergentes; se ha demostrado que los ASO dirigidos específicamente a *C9ORF72* reducen los focos de RNA y la producción de péptidos a partir de una traducción independiente de ATG (Jiang et al., 2016). También poseen el potencial de usarse in vivo para demostrar la eficacia de nuevas moléculas dirigidas a la estructura secundaria de la repetición *C9ORF72* que contiene RNA o el uso potencial de la edición del genoma Cas9 para eliminar las repeticiones de expansión (Schludi y Edbauer, 2018; Batra, 2017).

2.2.2.4.2. *Rattus Norvegicus*

En la rata existen modelos con mutaciones en varios genes asociados a ELA como *SOD1*, *FUS* y *TDP-43* (Picher-Martel et al., 2016), aunque la variedad de modelos disponibles es muy inferior a los de ratón. Ratas con mutaciones en *SOD1* desarrollan degeneración de motoneuronas superiores e inferiores, similares a los hallazgos neuropatológicos en pacientes, además de pérdida de neuronas motoras en los núcleos trigémino, facial e hipogloso que corresponden a características de ELA bulbar (Kashlan et al., 2015). Una de las diferencias más notables con los modelos de ratón es la progresión más rápida que experimentan, tal vez debido a la degeneración de las motoneuronas de las vías respiratorias (Lladó et al., 2006). Se ha creado un modelo condicional de TDP-43 en el que la forma salvaje o mutante (M337V) se expresa bajo el control de un promotor que se puede silenciar tratando el transgénico con doxiciclina (Zhou

et al., 2010). La sobreexpresión de TDP-43 salvaje no produce un fenotipo patológico, lo que indica que el fenotipo patológico es debido a la mutación y no a una sobreexpresión de TDP-43. El transgénico mutado muestra degeneración neuronal pero pocas inclusiones de TDP-43 (Van Den Bosch, 2011). Por otro lado, modelos de rata que sobreexpresan FUS humano mutante muestran agregados proteicos, neurodegeneración y atrofia muscular mientras que aquellos que sobreexpresan FUS salvaje muestran defectos cognitivos sin fenotipo motor (Huang et al., 2011).

Los modelos de rata, al tener un mayor tamaño, permiten estudios que involucran manipulaciones complejas de LCR y médula espinal como administración intra cerebroespinal, intratecal y uso de minibombas osmóticas (Joyce et al., 2011). A pesar de ser fisiológicamente más similar al humano, el mayor tamaño supone un inconveniente ya que el coste es mucho mayor por las necesidades de alojamiento que requieren.

2.2.2.5. Otros animales

Aunque son menos utilizados, existen otros animales que se consideran modelos de ELA. Como el caso de los perros que padecen mielopatía degenerativa (Nardone et al., 2016) y caballos con enfermedad de motoneurona (Sasaki et al., 2016). También se están creando, aunque no se emplean ampliamente, modelos alternativos a los roedores como cerdos enanos transgénicos que portan la SOD1 humana mutada (Yang et al., 2014) y transgénicos TDP-43 M337V (G. Wang et al., 2015), así como primates no humanos (Uchida et al., 2012).

A pesar de todos los modelos descritos, la mayoría de los ensayos preclínicos con modelos experimentales que han tenido resultados positivos, como retrasar la edad de inicio de los síntomas y prolongar la supervivencia, han fallado o no han conseguido los mismos resultados en su traslación a fase clínica. No está claro si este fracaso se debe a limitaciones en los modelos experimentales o problemas en el diseño de los ensayos clínicos. Varias causas pueden explicar estos resultados negativos. En primer lugar, limitaciones en los diseños preclínicos y clínicos, por ejemplo, dosis, número de pacientes incluidos, duración y fase en la que comienza el tratamiento (Philips & Rothstein, 2015). En el caso de los modelos animales, en muchas ocasiones el potencial terapéutico de un fármaco o sustancia puede estar sobreestimado debido a que normalmente se trata al animal en estadio presintomático y esto no corresponde con los humanos, ya que siempre los enfermos de ELA al entrar en el ensayo clínico ya se encuentran con síntomas. En segundo lugar, podría también deberse a diferencias farmacodinámicas y farmacocinéticas existentes entre la especie humana y la murina. Y, en

tercer lugar, la gran heterogeneidad existente en humanos puede no correlacionar con solamente un modelo animal o celular de los descritos. A pesar de todas estas dificultades, son los modelos actuales existentes, por lo tanto, se debe de trabajar con ellos de la forma más rigurosa posible. Es necesario verificar, sobre todo si los resultados son positivos, que estos se repiten en varios experimentos, e incluso en varios modelos, de esta forma se espera lograr más eficazmente la translación de la terapia a los pacientes.

2.3. Aproximaciones terapéuticas en la ELA

Lamentablemente, a día de hoy, no existe cura para la ELA. A pesar de las intensas investigaciones sobre la enfermedad, no se conoce el origen y los mecanismos causantes de la misma están poco definidos. Actualmente, el tratamiento para los afectados de ELA intenta incrementar la calidad de vida de los enfermos; debe hacerse desde un punto de vista multidisciplinar que incluye neurólogos, psicólogos, nutricionistas, fisioterapeutas, neumólogos, logopedas, trabajadores sociales y personal sanitario especializado. También se realiza un abordaje farmacológico de los síntomas que se producen (espasticidad, sialorrea, disfagia, disartria, trombosis, cambios mentales, insuficiencia respiratoria), a pesar de que muchos de estos fármacos no se han probado en ensayos clínicos sino que su eficacia está basada en la acción sobre otras enfermedades (Hardiman et al., 2017). Se ha demostrado que este abordaje multidisciplinar prolonga la vida del paciente y mejora su calidad de vida (Hardiman et al., 2017).

Asimismo, se ha demostrado como diferentes suplementos pueden mejorar la calidad de vida. Es bastante frecuente que los afectados de ELA suplementen sus dietas con vitamina E, vitamina C, vitamina B, selenio, zinc, coenzima Q y otros antioxidantes. En este sentido, estudios de nuestro grupo de investigación demostraron que el enriquecimiento de la dieta con aceite de oliva virgen extra prolongaba la supervivencia del ratón mSOD1 (Oliván et al., 2014).

Actualmente solo dos fármacos han sido aprobados como modificadores de la ELA: Riluzol con actividad antiglutamatérgica y un antioxidante Edaravone, con resultados muy controvertidos.

2.3.1. Tratamientos experimentales en la ELA

Como acabamos de ver, al ser la ELA una enfermedad sin tratamiento efectivo, el desarrollo de nuevas terapias es de vital importancia; por tanto, son muy numerosos los tratamientos experimentales preclínicos y ensayos clínicos dirigidos a encontrar potenciales dianas terapéuticas. Cada vez se tienen más conocimientos sobre la etiopatogenia de la ELA, por eso, algunas estrategias están dirigidas a reducir o suprimir la expresión de los genes asociados a variantes de ELAF. Sin embargo, al no estar definida la causa de la enfermedad, la mayoría de los tratamientos experimentales están enfocados en modular los mecanismos implicados en la patogenia con el objetivo de conseguir ralentizar el progreso de la enfermedad o incluso frenarla, aumentando así la calidad y esperanza de vida de los afectados.

Existe una gran variedad de terapias experimentales que se encuentran en distintas fases de desarrollo. A continuación, se hace una breve descripción de algunas propuestas terapéuticas experimentales para la ELA agrupadas en base a los mecanismos moleculares o patológicos que intentan modificar. Además de los artículos publicados sobre ensayos clínicos, parte de la información aquí mostrada se ha extraído de diferentes fuentes de información (<http://www.als.net>; <http://www.clinicaltrials.gov>; <http://www.mndassociation.org>).

2.3.1.1. Terapia antiexcitotoxicidad

La alteración de la homeostasis del glutamato fue uno de los primeros mecanismos propuestos involucrados en la degeneración de las motoneuronas. La excitotoxicidad se deriva de una liberación excesiva de glutamato combinado con cambios en los receptores postsinápticos y el transporte del glutamato (Nowicka et al., 2019). A pesar de la existencia de numerosas terapias (Tabla 2.3) que han centrado su abordaje en controlar este exceso de señalización excitatoria, Riluzol sigue siendo el único fármaco antiexcitatorio aprobado como retardador de la ELA.

Riluzol es un inhibidor de glutamato aprobado por la FDA en 1995 y, aunque existen varias hipótesis, su mecanismo de acción exacto a nivel molecular se desconoce. Suele ser bien tolerado pero su potencia es limitada ya que solamente retrasa la necesidad de soporte vital y prolonga la vida de algunos pacientes unos 3 meses (Bensimon et al., 1994; Lacomblez et al., 1996). Existen datos contradictorios sobre la eficiencia del fármaco en las diferentes etapas de la enfermedad. Mientras que los estudios iniciales sugieren una mayor efectividad en las primeras etapas, un estudio que realiza un análisis retrospectivo, expone que su efectividad se produce en

la última etapa clínica (Fang et al., 2018). Estos datos dispares sugieren que Riluzol podría afectar o activar diferentes vías terapéuticas según el estadio de la enfermedad, con modulación transitoria de la excitotoxicidad en una fase temprana pasando a modular otras vías moleculares desconocidas que se involucran en etapas más tardías (Dharmadasa & Kiernan, 2018). También ha sido aprobado por la FDA una reformulación de este fármaco, se trata de una película soluble oral que se disuelve en la lengua sin necesidad de agua. Este hecho facilita la toma del fármaco a afectados que tengan disfagia y alimentación parenteral. Actualmente siguen en estudio distintas formulaciones orales de Riluzol. Sin embargo, otros fármacos o moléculas que modulan la concentración de glutamato en la sinapsis no han sido efectivos. Es el caso de Ceftriaxona, cefalosporina de tercera generación que, a pesar de aumentar la concentración del transportador EAAT2/SLC1A, retrasar la pérdida de fuerza muscular e incrementar la supervivencia en modelos animales de la enfermedad (Rothstein et al., 2005) no mejoró el deterioro funcional o la supervivencia en un ensayo clínico de fase III (Wobst et al., 2020).

Se han realizado otros enfoques terapéuticos como modular los canales iónicos dependientes de voltaje y el uso de antagonistas de los receptores de glutamato. Dentro de este último abordaje está Memantina, antagonista de receptores NMDA y utilizado en Alzheimer para mejorar la función cognitiva, pero sin resultados positivos en ensayos de fase II de ELA. Está en curso un nuevo ensayo multicéntrico doble ciego, controlado con placebo evaluando Memantina para determinar si es capaz de retrasar la progresión de la enfermedad y mejorar la neuropsiquiatría de los pacientes. Otro producto, el Perampanel, antagonista de receptores AMPA, ha demostrado la preservación de motoneuronas y función motora en un modelo murino (Akamatsu et al., 2016), actualmente hay 3 ensayos clínicos con diferentes diseños y dosis del mismo (Bedlack, 2019). Respecto a la modulación de canales iónicos activados por voltaje, la Mexiletina podría ser un candidato ya que, a pesar de no mostrar efectividad sobre la progresión, puede resultar beneficiosa como tratamiento sintomático para calambres musculares (Wobst et al., 2020).

| Nombre | Mecanismo de acción | Ensayo | Fase |
|--------------------|---------------------------------|---|----------|
| Riluzole | Inhibidor glutamato | | Aprobado |
| Ceftriaxona | Incrementa EAAT2 astrocítico | NCT00349622 | III |
| Memantina | Antagonista receptor NMDA | NCT02118727 | II* |
| Perampanel | Antagonista receptor AMPA | NCT03019419 NCT03377309 NCT03020797 | II * |
| Talampanel | Antagonista receptor AMPA | NCT00696332 | II |
| Retigabina | Agonista canales K ⁺ | NCT02450552 | II |
| Mexiletine | Bloqueo canales Na ⁺ | NCT02781454 | II |

Tabla 2.3. Ensayos clínicos en ELA mediante terapias antiexcitatorias. * activo

2.3.1.2. Terapias antioxidantes y/o estrés oxidativo

El SNC es especialmente vulnerable a los radicales libres y al estrés oxidativo que se produce, dañando macromoléculas celulares críticas que pueden conducir a la muerte celular por necrosis o apoptosis (Chiò et al., 2020). Debido a la importancia que tiene en la ELA, diversas terapias se han enfocado en eliminar o controlar este mecanismo (Tabla 2.4).

De hecho, el segundo fármaco modificador de la enfermedad aprobado más reciente es Edaravone, aprobado en Japón en 2015 (Radicut[®]), en Estados Unidos en 2017 (Radicava[®]), pero no en Europa. Edaravone es un potente antioxidante empleado originalmente como tratamiento para los accidentes cerebrovasculares isquémicos agudos. Su mecanismo de acción exacto en la ELA, al igual que ocurre con el Riluzol, es desconocido. Probablemente actúa sobre el estrés oxidativo que se genera en las motoneuronas y en las células gliales circundantes (Nowicka et al., 2019). Existe cierta polémica con este fármaco ya que la aprobación y comercialización están basadas en estudios clínicos que tienen cierta controversia. El primer ensayo de fase II se realizó con un seguimiento de solo 6 meses, únicamente en población japonesa y sin grupo control (Yoshino & Kimura, 2006). Posteriormente, se realizó un ensayo de fase II doble ciego controlado con placebo sin existir diferencias significativas entre los grupos de tratamiento y placebo (Abe et al., 2014). En 2017 un análisis post hoc del ensayo reveló que podría ser eficaz en un grupo de pacientes con unas características muy definidas (Takei et al., 2017). En consecuencia, se realizó un nuevo ensayo controlado con placebo que incluía solo pacientes con

esas características clínicas; el ensayo mostró una diferencia significativa modesta en las puntuaciones de ALSFRS-R (ALS Functional Rating Scale), encontrándose mejor los pacientes tratados con Edaravone (Abe et al., 2017). Por otro lado, no se ha realizado ningún estudio de supervivencia y en todos los ensayos se permitió el uso de Riluzol, lo que puede conducir a una sobreestimación de la eficacia de Edaravone. Además, el fármaco se administra de manera intravenosa y tiene efectos adversos importantes como lesiones subcutáneas, trastornos en la marcha, reacciones cutáneas y reacciones alérgicas a bisulfito de sodio.

Una deficiencia en vitamina B12 se ha asociado a lesiones en el SNC. La Metilcobalamina, es una forma activa de vitamina B12 e inhibe la degeneración neuronal al disminuir los niveles de homocisteína, que se encuentran elevados en pacientes (Zoccolella et al., 2010). Estudios preclínicos muestran que Metilcobalamina protege frente a la toxicidad del glutamato y promueve la regeneración nerviosa (Akinori Akaike et al., 1993; Watanabe et al., 1994). El análisis post hoc de un primer ensayo en pacientes revela que puede tener eficacia en aquellos que han sido diagnosticados antes del año de iniciar los síntomas (Kaji et al., 2019). Se encuentra activo un ensayo en fase III de reclutamiento cuyo objetivo es estudiar la eficacia clínica y seguridad en dosis altas (Chiò et al., 2020).

El urato, producto final del metabolismo de las purinas, es un potente antioxidante endógeno y ha mostrado tener un prometedor efecto neuroprotector en la enfermedad de Parkinson (Crotty et al., 2017); además, estudios epidemiológicos de ELA han correlacionado niveles altos de urato con una progresión mayor y más lenta (Atassi et al., 2014; Paganoni et al., 2012, 2018; Zhang et al., 2018). Un ensayo de fase I con Inosina, precursor del urato, ha mostrado seguridad y una elevación de urato (Nicholson et al., 2018). Actualmente hay un ensayo multicéntrico de fase II para confirmar estos hallazgos con un tiempo de exposición más prolongado.

Uno de los factores cruciales asociados con la producción y presencia de ROS es el hierro, especialmente a través de la reacción de Fenton, que produce radicales hidroxilo altamente reactivos (Petillon et al., 2019). Se ha descrito una alteración del metabolismo del hierro en modelos animales, así como en formas esporádicas y familiares (*SOD1* y *C9orf72*) de ELA, caracterizada por una acumulación de hierro en el SNC (Ignjatović et al., 2013; Lee et al., 2015). La alta concentración de hierro del cerebro, debido a su alta demanda energética, hace que las motoneuronas sean vulnerables al déficit energético y estrés oxidativo (Barp et al., 2020). Estudios en afectados de ELA han evidenciado signos de acumulación de hierro en el SNC, además, un nivel alto de ferritina sérica se asocia con un peor pronóstico (Veyrat-Durebex et al., 2014). El uso de quelantes de hierro ha mostrado neuroprotección en modelos animales,

sugiriendo que la eliminación del exceso de hierro puede tener efectos beneficiosos (Golko-Perez et al., 2016). El quelante Deferiprona, elimina el exceso de hierro, reduce el daño oxidativo y la muerte celular asociados con los depósitos de hierro sin un impacto aparentemente negativo en los niveles de hierro necesarios (Barp et al., 2020). Actualmente se está evaluando la eficacia en un estudio multicéntrico de fase III.

Epi-589 es un compuesto que aumenta los niveles del antioxidante glutatión. Se ha realizado un ensayo en fase II pero no existen publicaciones que detallen su mecanismo de acción ni sus efectos en animales modelo de ELA (Wobst et al., 2020).

| Nombre | Mecanismo de acción | Ensayo | Fase |
|------------------------|-----------------------------------|-------------|----------|
| Edaravone | Eliminación de radicales libres | | Aprobado |
| Metilcobalamina | Disminuye niveles de homocisteína | NCT03548311 | III* |
| Inosina | Antioxidante | NCT03168711 | II* |
| Deferiprona | Quelante de hierro | NCT03293069 | II-III* |
| Epi-589 | Modulación niveles glutatión | NCT02460679 | II |

Tabla 5.2. Ensayos clínicos en ELA mediante terapias antioxidantes. *activo.

2.3.1.3. Modulación de la función mitocondrial y apoptosis

Dada la importancia de la mitocondria en la patología de la ELA, otros abordajes terapéuticos van dirigidos a restaurar la función mitocondrial mediante diferentes enfoques como disminuir la generación de ROS, incrementar la biogénesis mitocondrial o inhibir las vías apoptóticas (Tabla 2.5).

Una de las posibles dianas terapéuticas estudiadas ha sido la enzima MAO-B (monoamino oxidasa B), que participa en el catabolismo de neurotransmisores y se localiza en la cara externa de la mitocondria. Rasagilina es un potente inhibidor irreversible de esta enzima y se utiliza para el tratamiento de Parkinson; sus propiedades neuroprotectoras se han demostrado en estudios *in vitro* e *in vivo*, mostrando efectos beneficiosos sobre la función motora y la supervivencia tras su administración en el ratón mSOD1 de manera dosis dependiente (Waibel et al., 2004). Un estudio de fase II mostró que, tras la administración de Rasagilina, se producía un aumento en el potencial de membrana mitocondrial y una disminución de los marcadores apoptóticos en sangre (Macchi et al., 2015). Otros dos estudios

de fase II controlados con placebo evaluaron la seguridad y eficacia del fármaco, pero, aunque resultaron seguros y sin grandes efectos adversos, no mostraron resultados positivos en cuanto a supervivencia ni progresión (Ludolph et al., 2018; Statland et al., 2019).

Dexpramipexole, otro fármaco comercializado para la enfermedad de Parkinson, es un inhibidor del poro de transición de permeabilidad mitocondrial que se abre ante estímulos como estrés oxidativo, excitotoxicidad y disminución de ATP, produciéndose aumento de ROS y desequilibrio electroquímico. El fármaco actúa incrementando la producción de adenosina trifosfato (ATP); se realizó un ensayo en fase III pero, al no alcanzarse los resultados de eficiencia deseados, se paralizó el estudio (Cudkowicz et al., 2013). Oleoxime, otro compuesto que también modula la función mitocondrial, no mostró un efecto positivo en un ensayo de fase III a pesar de sus resultados beneficiosos en modelos animales.

El ácido tauroursodesoxicólico (TUDCA) se emplea como tratamiento para enfermedades hepáticas crónicas, por lo que su administración crónica en humanos es segura y bien tolerada. El enfoque terapéutico reside en la modulación de la vía mitocondrial mediante la inhibición de la apoptosis (Chiò et al., 2020). Actualmente hay un ensayo de fase III para establecer la seguridad y eficacia del medicamento en combinación con Riluzol (<https://www.tudca.eu>). AMX0035 es una combinación de TUDCA y fenilbutirato de sodio. Recibió en 2017 el estatus de medicamento huérfano como tratamiento para la ELA. El enfoque terapéutico de este compuesto se basa en la reducción del estrés que se genera en la mitocondria y el retículo endoplasmático, ya que son mediadores clave en la muerte celular y neuroinflamación. Actualmente está en desarrollando un ensayo clínico en fase II cuyo objetivo principal es evaluar la tolerabilidad y seguridad del AMX0035 pero también se buscan evidencias de su efectividad.

| Nombre | Mecanismo de acción | Ensayo | Fase |
|-----------------------|---|----------------------------|-------------|
| Rasagilina | Inhibidor enzima MAO-B | NCT01879241 NCT01232738 | II |
| Dexpramipexole | Inhibe poro de transición de permeabilidad mitocondrial | NCT01281189 | III |
| Oleoxime | Inhibe poro de transición de permeabilidad mitocondrial | NCT00868166 | II/III |
| TUDCA | Inhibe caspasa-3 | NCT03800524 | III* |
| AMX0035 | Antiapoptótico | NCT03127514 | II* |

Tabla 2.5. Ensayos clínicos en ELA mediante terapias mitocondriales. * activo.

2.3.1.4. Terapia antiagregados y modulación de la autofagia

Los agregados proteicos son una característica histopatológica distintiva de las enfermedades neurodegenerativas. Esta presencia de agregados insolubles sugiere que los procesos de degradación y aclaramiento autofágico son insuficientes para afrontar la patología molecular asociada a estas enfermedades. La incorrecta eliminación produce la acumulación de agregados que terminan interfiriendo en el resto de procesos celulares contribuyendo a la degeneración. Se han realizado distintos enfoques terapéuticos como evitar su incorrecto plegamiento y mejorar la autofagia como vía de eliminación (Tabla 2.6)

El Arimoclomol aumenta la producción y prolonga la respuesta de proteínas de choque térmico (HSPs), cuyo efecto es promover el plegamiento de proteínas nativas y el replegamiento de proteínas mal plegadas. El producto es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y mostró su efecto beneficioso en el modelo murino SOD1G93A, disminuyendo los agregados de proteína SOD1 en el SNC (Kalmar et al., 2008; Kieran et al., 2004). En un estudio en fase II realizado en una población genotípicamente homogénea (pacientes con un subconjunto de mutaciones en *SOD1* asociadas a una rápida progresión), el fármaco experimental fue seguro, bien tolerado y mostró indicios de un posible efecto beneficioso (Benatar et al., 2018). Actualmente se encuentra en desarrollo un ensayo en fase III.

Dos mecanismos que contribuyen a la neurodegeneración en la ELA, como se ha comentado anteriormente, son la eliminación ineficaz de agregados proteicos y la prevalencia de la función neurotóxica sobre la neuroprotectora debido a un desequilibrio del sistema inmune. Estos dos mecanismos son las bases terapéuticas del fármaco Rapamicina (Wobst et al., 2020), usado frecuentemente en trasplantes para evitar rechazo. Rapamicina es un activador de autofagia dependiente de diana de Rapamicina en células de mamífero (mTOR) que mejora la degradación proteica y regula la respuesta inmune (suprime las respuestas neurotóxicas inflamatorias mediadas por las células T) (Mandrioli et al., 2018). Estudios preclínicos en modelos animales han mostrado una mejora en el fenotipo motor y cognitivo (Mandrioli et al., 2018). Actualmente se encuentra un ensayo clínico fase II multicéntrico.

El sistema de control de calidad de proteínas comprende una gran cantidad de factores que pueden actuar específicamente en algunos compartimentos subcelulares o expresarse específicamente en células o tejidos. Uno de ellos, la proteína de choque térmico B8 (HSPB8), promueve la eliminación mediada por autofagia de los fragmentos mutantes de las proteínas SOD1 y TDP-43 mal plegadas de las motoneuronas (Cristofani et al., 2019). Además, se une a la proteína HSP70 formando el complejo HSPB8-BAG3-HSP70 que mantiene la llamada

"granulostasis", un mecanismo de vigilancia que evita la conversión de gránulos de estrés dinámico en conjuntos propensos a la agregación (Alberti et al., 2017). La Colchicina, además de poseer actividad antiinflamatoria, mejora la expresión de HSPB8 y bloquea la acumulación de TDP-43 en las neuronas (Barp et al., 2020). En base a estas observaciones, actualmente hay un ensayo en fase II en proceso de reclutamiento para estudiar la efectividad de la Colchicina. Por último, el tamoxifeno activa la autofagia dependiente de mTOR y aumenta los niveles de BCL2 y Beclin-1 (BECN1) proteínas implicadas en la formación y maduración de autofagosomas. Estudios preclínicos muestran una mejora de la patología en modelos TDP-43 tras la administración del fármaco (Wang et al., 2012). Recientemente se ha realizado un ensayo clínico con el fármaco pero los resultados han sido modestos en cuanto a ralentizar la progresión (Chen et al., 2020).

Una estrategia alternativa para reducir los agregados tiene como diana el RNA mensajero y su reducción mediante el uso de ASO, oligonucleótidos sintéticos cortos que se unen al RNAm diana y pueden reducir la expresión de una proteína mediante la degradación del RNAm por la RNasa H endógena o por el bloqueo de la traducción del RNAm (Chiò et al., 2020). Los ASO han demostrado una eficacia sorprendente en estudios preclínicos que utilizan modelos animales o células humanas (Kim et al., 2020). Actualmente hay dos ensayos de terapia ASO para el gen *SOD1* y *C9ORF72*. Tofersen es un ASO que media en la degradación del ARNm de *SOD1* para reducir la síntesis de la proteína SOD1. El estudio de fase I-II mostró una reducción significativa de SOD1 en LCR además de una desaceleración del deterioro funcional (Miller et al., 2020). Actualmente está en curso un ensayo de fase III controlado con placebo. También está en curso un ensayo de fase I con BIIB078, ASO dirigido al RNAm de *C9ORF2* para reducir la proteína anormal. Estudios preclínicos con iPSC y ratones transgénicos mostraron reducción de focos de RNA y mejora del comportamiento y cognición al tratamiento con BIIB078 (Chiò et al., 2020).

| Nombre | Mecanismo de acción | Ensayo | Fase |
|---------------------------|------------------------------------|-------------|------|
| Arimoclomol | Induce proteínas de choque térmico | NCT03491462 | III* |
| Rapamicina | Inhibe mTOR | NCT03359538 | II* |
| Tamoxifeno | Aumenta BECN ₁ | NCT02166944 | I-II |
| Colchicina | Aumenta HSPB8 | NCT3693781 | II* |
| BIIB078 | ASO contra <i>C9ORF72</i> mutada | NCT03626012 | I* |
| BIIB067 (Tofersen) | ASO contra <i>SOD1</i> mutada | NCT02623699 | III* |

Tabla 2.6. Ensayos clínicos en ELA mediante terapias antiagregados, *activo.

2.3.1.5. Factores neurotróficos

La característica principal de la fisiopatología de la ELA es la degeneración del tejido neural, por ello, los factores neurotróficos y neuroprotectores han sido desde hace años una vía de estudio terapéutica para las enfermedades neurodegenerativas, ya que promueven la supervivencia, formación de sinapsis, crecimiento axonal, diferenciación neuronal y protegen contra lesiones tóxicas y oxidativas (Henriques et al., 2010). Este abordaje es totalmente distinto a los propuestos anteriormente ya que en vez de centrar como diana terapéutica el bloqueo o eliminación de un proceso patológico, se centran en estimular la reparación y/o conservación de las neuronas lesionadas y en promover el crecimiento de nuevo tejido neural.

Debido al gran potencial terapéutico que presentan, se ha investigado un considerable número de factores tróficos, algunos de los cuales han mostrado un efecto neuroprotector, además de promover la supervivencia celular tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*; es el caso de CNTF (factor neurotrófico ciliar), BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro), GDNF (factor neurotrófico derivado de células gliales), IGF-1 (factor de crecimiento similar a la insulina 1), VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) y G-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos) (Gouel et al., 2019; Rando et al., 2016). Sin embargo, a pesar de los prometedores resultados en los ensayos preclínicos, en su traslación a ensayos clínicos los resultados han sido modestos o nulos. Estos resultados negativos pueden deberse a diversos factores como vía de administración inadecuada, dosis insuficiente, vida media de la molécula demasiado corta, capacidad mínima de atravesar la barrera hematoencefálica, inicio tardío del tratamiento o la necesidad de asociación sinérgica de varios factores neurotróficos (Gouel et al., 2019). Con el fin de mejorar la infusión de estos factores y evitar los problemas antes citados, se han desarrollado otras estrategias como la terapia génica y la terapia basada en células madre que expresan factores neurotróficos. Ambos tipos de estrategias se han estudiado en modelos animales con resultados beneficiosos.

Estudios de nuestro grupo de investigación sobre el potencial papel del fragmento C-terminal (TTC) de la toxina del tétanos como molécula terapéutica, han mostrado su naturaleza no tóxica y sus propiedades neuroprotectoras, convirtiéndola en una potencial molécula portadora a través del SNC y terapéutica para los trastornos neurológicos (Calvo et al., 2011; Toivonen et al., 2010). Estudios con el modelo murino SOD1G93A mostraron que el DNA desnudo que codifica para el fragmento C de la toxina tetánica (TTC) mejoró la disminución de la inervación de los músculos de las extremidades posteriores, retrasó significativamente la aparición de síntomas y déficits funcionales, mejoró la supervivencia de las neuronas motoras

espinales y prolongó la vida de los animales (Moreno-Igoa et al., 2010). Asimismo, estudios previos *in vitro* con la proteína TTC mostraron resultados similares (Ciriza et al., 2008). Por otro lado, un estudio reciente muestra niveles disminuidos de IL-6 en tejidos del modelo murino SOD1G93A, sugiriendo un potencial papel antiinflamatorio de TTC (Moreno-Martinez et al., 2020)

Actualmente no hay descritos ensayos clínicos de terapia génica pero sí algunos ensayos clínicos basados en terapia celular (Tabla 2.7). Si bien la mayoría de estas células no están modificadas genéticamente para la producción de factores neurotróficos, el efecto terapéutico observado tras su trasplante es debido a la producción por parte de dichas células de factores tróficos (Martínez-Muriana et al., 2020; Rando et al., 2018). Estos estudios emplean células madre mesenquimales (MSCs) de diferentes orígenes (tejido neural, adiposo, médula ósea) a través de diferentes administraciones (intratecal, intraespinal, intramuscular, intravenoso o intraventricular). Apenas hay resultados de los mismos y aún no se sabe con certeza aspectos importantes como tipo de administración más idónea, momento más eficaz de la intervención, número de células a trasplantar para obtener eficacia, capacidad de migración y efectividad de las células y una evolución de la eficacia a largo plazo, por lo que aún es prematuro concluir si resulta una terapia efectiva (Gouel et al., 2019).

| Nombre | Mecanismo de acción | Ensayo | Fase |
|--------------------|--|-------------|-------|
| IGF-1 | IGF-1 humano recombinante | NCT00035815 | III |
| rhEPO | Eritropoyetina humana recombinante | NCT03835507 | I-II* |
| Nurown | MSC-TNF cultivadas ex vivo | NCT03280056 | III* |
| MSC adiposo | Autólogo, intravenoso | NCT02290886 | I/II* |
| MSC adiposo | Autólogo, intratecal | NCT03268603 | II* |
| VM202 | factor de crecimiento del hepatocito (HGF) | NCT02039401 | I/II |
| GM604 | Fragmento peptídico de factor motoneurotrófico | NCT01854294 | Ila |

Tabla 2.7. Ensayos clínicos en ELA mediante factores neurotróficos. * activo.

2.3.1.6. Terapias anti-neuroinflamación

La búsqueda de potenciales dianas terapéuticas implicadas en el complejo proceso de la neuroinflamación ha cobrado mucha relevancia en los últimos años como posible tratamiento efectivo de la ELA. Se han realizado diversas aproximaciones terapéuticas tanto con efecto inmunosupresor como efecto inmunomodulador y, dirigidas tanto a moléculas como a poblaciones celulares (Tabla 2.8). Aunque muchos de estos fármacos han tenido sus éxitos más o menos relevantes en animales modelo de ELA, el traslado a la clínica no ha sido tan satisfactorio.

Astroцитos, microglia y células T promueven la inflamación en la ELA causando la infiltración de células inmunes y la producción de citocinas inflamatorias. Por ello, varias estrategias terapéuticas se centran en suprimir dicha señalización mediante diversos abordajes. Ibudilast (MN-166), inhibidor de la fosfodiesterasa-4 y -10, es una molécula pequeña capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y reducir la activación microglial, inhibir el reclutamiento de macrófagos al SNC y desencadenar la liberación de factores neurotróficos (Cho et al., 2010). Un ensayo en fase II mostró seguridad y un potencial beneficio en la supervivencia. Actualmente están reclutando pacientes para el desarrollo de un ensayo en fase III (Chiò et al., 2020). Un regulador importante de la actividad y fenotipo microglial es la ruta de señalización de Rho-quinasa (ROCK), implicada en la migración, fagocitosis y liberación de citosinas inflamatorias. Fasudil, inhibidor de ROCK, ha mostrado efectos beneficiosos en cultivos celulares y modelos animales (Roser et al., 2017). Actualmente hay un ensayo de fase II que se encuentra en fase de reclutamiento. Otra posible diana terapéutica es la quinasa RIPK1 (receptor interacting serine/threonine kinase), mediador clave de la muerte celular apoptótica y necrótica, así como de las vías inflamatorias (Chiò et al., 2020). Se ha relacionado con la ELA una desregulación de RIPK1 (Degterev et al., 2019; Ito et al., 2016). Un inhibidor de RIPK1 que se encuentra en un ensayo de fase 1 es DNL747, compuesto experimental que se cree que actúa suprimiendo la producción de citoquinas proinflamatorias dependientes de RIPK1 en la microglía.

Por otra parte, varias terapias están dirigidas a suprimir la señalización del factor nuclear κB (NF- κB) a través de mecanismos diversos. Es el caso de NP001, se trata de una formulación intravenosa de cloruro de sodio con pH ajustado que, a pesar de disminuir la expresión del NF- κB , no desaceleró el deterioro funcional en un ensayo de fase II (Wobst et al., 2020). Otro compuesto que ejerce sus efectos antiinflamatorios al suprimir la activación de la ruta NF- κB es RNS60, compuesto experimental que ha tenido por la FDA la designación de vía rápida a la

terapia experimental y ha mostrado propiedades neuroprotectoras en modelos preclínicos de ELA (Vallarola et al., 2018). Un estudio piloto mostró seguridad y buena tolerancia a largo plazo de RNS60; actualmente hay en proceso un ensayo en fase II.

Otra de las estrategias planteadas es impedir la entrada al SNC de células inflamatorias periféricas; de esta manera se reduciría la fase M1 neurotóxica que se produce en etapas más avanzadas. Entre los fármacos propuestos está Fingolimod, fármaco aprobado como tratamiento para la Esclerosis Múltiple remitente recurrente. Es un modulador del receptor de la esfingosina-1-fosfato y actúa reteniendo los linfocitos T en los órganos linfoides secundarios, disminuyendo así la cantidad de linfocitos T circulantes. Estudios en ratón SOD1G9A han mostrado el potencial neuroprotector del fármaco (Potenza et al., 2016). Un ensayo clínico en fase IIa mostró seguridad y tolerabilidad del fármaco, además una disminución de linfocitos T circulantes (Berry et al., 2017).

También se han realizado intervenciones terapéuticas destinadas a suprimir la respuesta de citocinas proinflamatorias. Es el caso de Tocilizumab, anticuerpo monoclonal dirigido al receptor de interleuquina-6 (IL6R) y aprobado para el tratamiento de artritis reumatoide. El fármaco mostró buenos resultados en estudios in vitro con muestras de pacientes (Fiala et al., 2013; Mizwicki et al., 2012). Recientemente se completó un ensayo de fase II, pero todavía no hay resultados publicados.

Varios ensayos están centrados en la regulación de los linfocitos T reguladores (Treg) ya que se han relacionado con la progresión de la enfermedad y supervivencia (Sheean et al., 2018). El tratamiento con anticuerpos monoclonales de interleuquina-2 (IL-2) fue capaz de estimular y aumentar el número de Treg en el modelo SOD1G93A, retrasando la progresión de la enfermedad y prolongando la supervivencia (Beers et al., 2011). Actualmente, se está llevando a cabo el estudio MIROCALS, ensayo de fase II administrando dosis bajas de IL-2 como un estimulador de los Treg. Con un enfoque metodológico diferente, pero con el mismo objetivo, se realizó un ensayo de fase I en el cual se infundieron Tregs autólogos, previa expansión *ex vivo*, a pacientes de ELA. Las infusiones eran seguras y se demostró que mejoraron tanto el número de Treg como las funciones supresoras de inflamación (Sheean et al., 2018). Actualmente, se está llevando a cabo un ensayo de fase IIa de infusión de Treg autólogos en combinación con dosis bajas de IL-2 (Barp et al., 2020).

| Nombre | Mecanismo acción | Núm. ensayo | Fase |
|-----------------------------|---|-----------------------------|-------------------|
| Ibudilast (MN-166) | Inhibe fosfodiesterasa 4 y 10 y factor migración macrófagos | NCT02238626 NCT04057898. | Ib/IIa II/III* |
| Fasudil | Inhibe ROCK | NCT03792490 | IIa* |
| Tocilizumab | Anticuerpo IL-6R | NCT02469896 | II |
| IL-2 | Aumenta Treg | NCT03039673 | II* |
| Treg autólogos +IL-2 | Modulación sistema inmune | NCT04055623 | II* |
| NP001 | Modula expresión NF-κB y producción IL-1B | NCT02794857 | II |
| Fingolimod | Agonista esfingosina 1 fosfato, reduce linfocitos T circulantes | NCT01786174 | II |
| Minociclina | Suprime activación microglial | NCT00047723 | III |
| DNL747 | Inhibidor RIPK1 | NCT3757351 | I* |
| Celecoxib | Inhibe COX-2 | NCT00355576 | II |
| Ono-2506 | Modula actividad astrocitos | NCT00694941 | II |
| RNS60 | Suprime actividad vía NF- κB | NCT03456882 | II* |

Tabla 2.8. Ensayos clínicos en ELA mediante terapias antineuroinflamatorias. *activos

2.3.1.7. Protección de la unión neuromuscular y músculo esquelético

Otra diana terapéutica propuesta para la ELA es el músculo ya que la degeneración de la placa motora y la retracción del axón son eventos que suceden antes de la pérdida de los cuerpos neuronales. Las fibras musculares no reciben suficiente aporte eléctrico, por tanto, se ha propuesto que incrementar la contracción muscular en respuesta a una determinada señal de entrada podría ralentizar el deterioro de la fuerza muscular en la ELA (Wobst et al., 2020). Algunos de los ensayos clínicos realizados se muestran en la Tabla 2.9.

Con esta hipótesis se desarrolló Tirasemtiv, activador selectivo de troponina muscular esquelética rápida que modula la contractibilidad del músculo esquelético, aumentando la sensibilidad del tejido al calcio. Esta terapia va dirigida a mejorar la fuerza y resistencia de músculos esqueléticos y resulta especialmente importante para los músculos intercostales y diafragma ya que están directamente implicados en la respiración. Un estudio de fase III no se completó debido a la alta tasa de abandonos al ser mal tolerado por los pacientes (Collibee et al., 2018).

Otro fármaco estudiado es Reldesemtiv (CK-2127107), activador de troponina de segunda generación más potente y mejor tolerado. Un análisis post hoc de su ensayo clínico en fase II realizado sugiere un efecto beneficioso (Chiò et al., 2020).

Por último, Levosimendán se une selectivamente a la troponina C sensibilizando al calcio las fibras rápidas y lentas del músculo esquelético, ha sido propuesto como beneficioso para la enfermedad. Actualmente se encuentra en un ensayo clínico en fase III (Al-Chalabi et al., 2019).

| Nombre | Mecanismo de acción | Ensayo | Fase |
|---------------------|-----------------------|-------------|------|
| Tirasemtiv | Activa troponina FAST | NCT03491462 | III |
| Reldesemtiv | Activa troponina FAST | NCT03160898 | II* |
| Levosimendan | Activa Troponina C | NCT03505021 | III* |

Tabla 2.9. Ensayos clínicos en ELA mediante protección de músculo. *activo.

A pesar de los grandes esfuerzos de ensayos clínicos y los avances hacia la comprensión de las vías genéticas, epigenéticas y moleculares vinculadas a la fisiopatología de la ELA a lo largo de los años, la traducción terapéutica es lenta y escasa y, en la mayoría de los casos, con resultados negativos. Esto es un fiel reflejo de la complejidad etiológica y la heterogeneidad subyacente de la ELA, lo que implica que no todos los afectados comparten el mismo origen ni los mismos mecanismos patológicos. Además, resulta complicado encontrar grupos de pacientes con subfenotipos similares y, aunque se lograra, seguramente no coincidirían completamente. Otra desventaja importante es la dificultad inherente en el acceso al SNC, ya que la barrera hematoencefálica limita la penetración de muchas moléculas. A todo lo anterior hay que añadir la inexistencia de biomarcadores pronóstico que puedan indicar en qué fase de la enfermedad se está y biomarcadores predictivos que, en caso de recibir un tratamiento experimental, puedan indicar la efectividad del fármaco sobre la progresión de la enfermedad.

La investigación tradicional de nuevos medicamentos implica un largo periodo en el proceso de creación de nuevos fármacos, además de ser un desarrollo que conlleva un elevado coste. Estas dificultades han llevado a la comunidad científica a plantear nuevas vías para abordar este problema; como el reposicionamiento de fármacos, es decir, el uso de un

medicamento ya autorizado para tratar una afección específica que puede ser potencialmente eficaz para tratar otras enfermedades. Esta estrategia resulta una buena oportunidad para encontrar tratamientos potenciales para la ELA ya que permite disponer de un perfil de seguridad y eficacia ya conocidos, con lo que el tiempo necesario para obtener su aprobación se reduciría considerablemente. Este acortamiento de tiempo es muy importante para enfermedades neurodegenerativas como la ELA, enfermedad sin cura donde el tiempo es clave debido a la rapidez de la progresión. Por otro lado, el hecho de ser una enfermedad minoritaria supone un problema para las farmacéuticas ya que la inversión económica que se tiene que realizar cuando se trata de un medicamento novedoso no aprobado o comercializado, no puede recuperarse debido al escaso número de pacientes a las que puede ir destinado dicho fármaco.

2.3.1.8 Terapia inhibidores de la división celular

A pesar de no ser muy numerosos los ensayos para este tipo de terapia, se ha considerado realizar un apartado debido al tema de la presente tesis doctoral, centrado en un antineoplásico como posible tratamiento en la ELA.

De hecho, el Masitinib es un inhibidor de la tirosina kinasa c-kit y utilizado como tratamiento para tumores mastocíticos en perros. Este medicamento ha mostrado una actividad preclínica prometedora en modelos animales ejerciendo neuroprotección a través de sus propiedades inmunomoduladoras y, en particular, a través del bloqueo de la proliferación y activación de la microglía y la degranulación mediada por mastocitos tanto en el SNC como en el periférico (Trias et al., 2016, 2018). Un estudio en fase II (NCT 02588677) ha mostrado su efecto beneficioso en un subgrupo de pacientes (Mora et al., 2020). Actualmente está en fase de reclutamiento un ensayo de fase III (NCT03127267).

Varias líneas de evidencia sugirieron que la vía de señalización del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) podría desempeñar un papel en la patología de las afecciones neurodegenerativas en general y específicamente en la ELA. EGFR se encontró sobreexpresado en la médula espinal de pacientes, así como en la del modelo de ratón SOD1G93A (Offen et al., 2009). Además, el tratamiento con inhibidores de EGFR resultó neuroprotector en un modelo de rata de lesión de la médula espinal (Erschbamer et al., 2007). En base a esto se realizó un estudio sugiriendo que la inhibición farmacológica de la señalización de EGFR podría ser una estrategia factible para ralentizar la progresión de esta enfermedad (Le Pichon et al., 2013). Un estudio en el modelo SOD1G93A con Erlonitib, inhibidor de EGFR usado frecuentemente para cáncer de

pulmón, mostró un retraso modesto en el inicio de los síntomas, falta de protección de las sinapsis neuromusculares y no prolongó la supervivencia de los animales (Le Pichon et al., 2013).

Un estudio realizado en nuestro laboratorio, en el que se analizó el efecto de agentes movilizadores conocidos de células madre (tratamiento) y antimetabolito 5-fluorouracilo (5-FU) (anti-tratamiento) en el modelo murino SOD1G93A, mostró un resultado muy sorprendente; el fármaco antineoplásico 5-FU mejoró el rendimiento motor, retrasó la aparición de la enfermedad y prolongó sustancialmente la supervivencia de los animales (Rando et al., 2019). Estos datos sugieren que el 5-FU o fármacos similares pueden ser posibles fármacos candidatos para el tratamiento de enfermedades de motoneurona como la ELA, a través del conocido reposicionamiento de fármacos. Debido a que el 5-FU es el centro de la presente Tesis Doctoral, se desarrollarán más extensamente las características del mismo a continuación.

2.4. 5-Fluorouracilo

2.4.1. Definición y mecanismos de acción

El 5-Fluorouracilo (5-fluoro-1*H*-pyrimidine-2,4-dione) o 5-FU es un análogo del uracilo en el que el hidrógeno de la posición C-5 del anillo pirimidínico ha sido sustituido por un átomo de flúor (Figura 13). El fármaco fue desarrollado en la década de los 50 tras observar que los hepatomas de rata usaban la pirimidina uracilo, una de las cuatro bases que se encuentran en el RNA, más rápidamente que los tejidos normales (Heidelberger et al., 1957).

Es un fármaco ampliamente usado, solo o en combinación con otros quimioterápicos, para el tratamiento de diversos tipos de tumores sólidos de mama, cuello, estómago, colon y recto. Aunque existen diversos tipos de administración, la vía parenteral mediante infusión continua es la más recomendada y frecuente, por el contrario, está desaconsejada la administración oral ya que la absorción del 5-FU por esta vía es muy discontinua.

El 5-FU entra rápidamente en la célula mediante difusión no facilitada a través de los mismos mecanismos de transporte facilitado de las bases púricas y pirimidínicas (Grem, 1997). Una vez en el interior celular, se incorpora a rutas anabólicas en las que se transforma en diferentes metabolitos activos: fluorodesoxiuridina monofosfato (FdUMP), trifosfato de desoxifluorouridina (FdUTP), y trifosfato de fluorouridina (FUTP) (Figura 13). FdUTP y FUTP se incorporan respectivamente a las hebras de DNA o RNA de forma aberrante y la FdUMP inhibe la

acción de la Timidilato sintetasa (TS), enzima formadora del nucleótido de timidina (Longley et al., 2003). La ruta catabólica ocurre principalmente en el hígado donde la enzima dihidroprimidina deshidrogenasa (DPD) convierte el 5-FU en dihidrofluorouracilo (DHFU) que posteriormente es excretado en orina principalmente en forma de α -fluoro- β -alanina (FBAL) (Longley et al., 2003; Miura et al., 2010)(Figura 2.13).

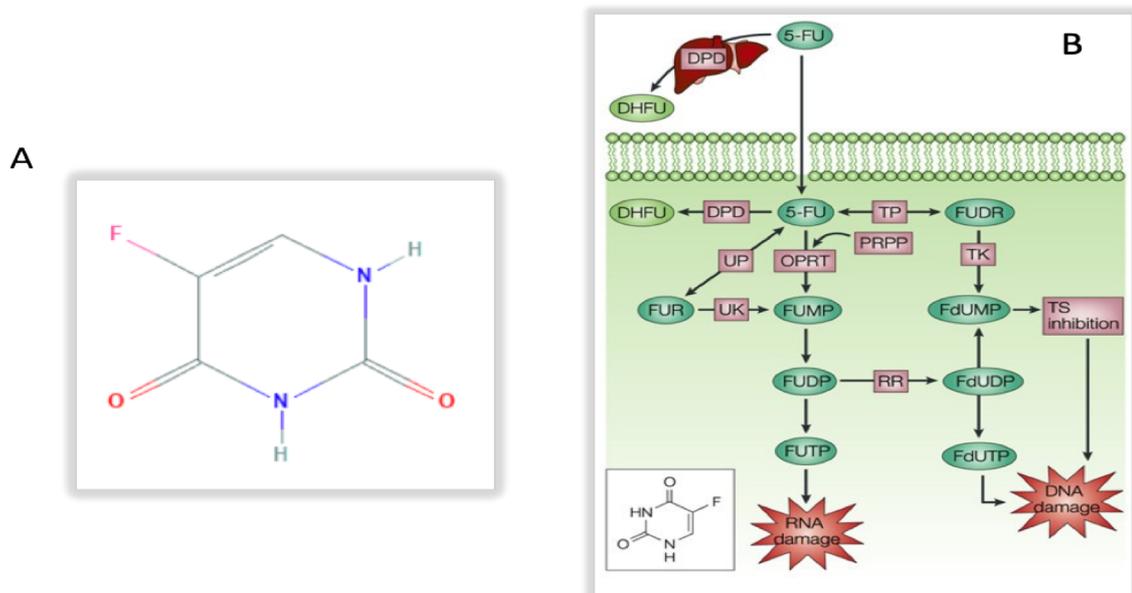


Figura 2.13. (A) Estructura del 5-FU y (B) Metabolismo del 5-FU (Longley et al., 2003)

2.4.2. Efecto a nivel de ácidos nucleicos

El 5-FU inhibe la síntesis celular mediante dos mecanismos alternativos pero relacionados. Por un lado, se incorpora de forma aberrante a los ácidos nucleicos en formación, DNA y RNA, pudiendo llegarse a producir la muerte por apoptosis cuando los mecanismos reparadores de la célula se ven sobrepasados. Por otro, inhibe la enzima TS, enzima crucial para la síntesis de novo de timidilato (dTMP) (Figura 2.14), metabolito indispensable para la síntesis de DNA (van Kuilenburg, 2004). La TS cataliza la metilación reductiva de la desoxiuridina monofosfato (dUMP) a desoxitimidina monofosfato (dTMP), con la participación del folato reducido, 5,10-metilentetrahidrofolato (CH_2THF), como dador de metilo (Figura 2.14). Como ya se ha comentado, esta reacción es la única fuente de novo del timidilato, metabolito imprescindible para la replicación y reparación del DNA. La proteína TS, funciona como un dímero, y ambas subunidades contienen un sitio de unión a nucleótidos y otro al folato reducido

(CH₂THF). El 5-FU, en su forma de metabolito activo FdUMP, se une covalentemente al sitio de unión de nucleótidos de la enzima TS, formando un complejo ternario estable con la enzima y con CH₂THF. Este complejo no puede ser separado en sus componentes y la enzima permanece secuestrada e inactiva. El secuestro de la TS inhibe la síntesis de la desoxitimidina monofostato (dTMP) y bloquea la síntesis de novo de dTTP (Longley et al., 2003).

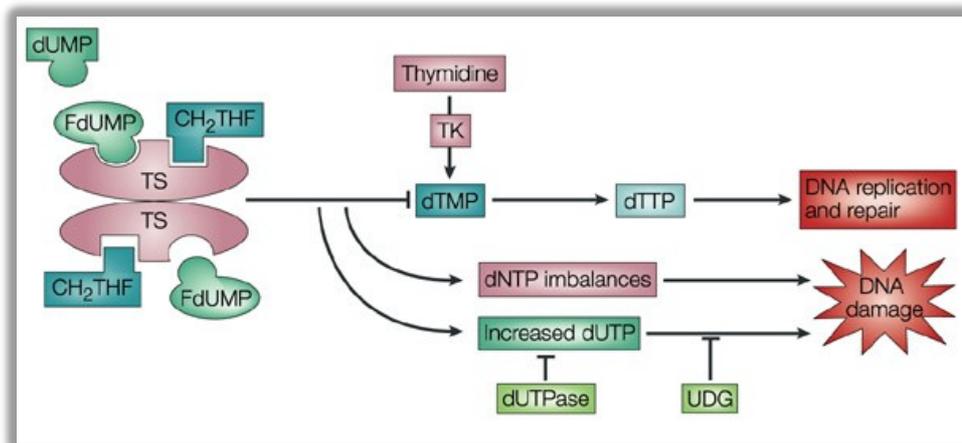


Figura 2. Efectos del 5-FU sobre los ácidos nucleicos (Longley et al., 2003).

El complejo ternario bloquea el acceso de dUMP a la TS por competencia con FdUMP, dando como resultado desequilibrios en el conjunto de desoxinucleótidos, especialmente un nivel elevado de dUTP; tanto el dUTP como el metabolito del 5-FU, el FdUTP, pueden incorporarse de forma errónea al DNA. La reparación de estas incorporaciones se llevaría a cabo mediante la escisión de estos nucleótidos por la enzima uracil-DNA-glicosilasa (UDG) pero en presencia de altos ratios (F)dUTP/dTTP es ineficaz y solo desencadena más incorporación errónea de estos falsos nucleótidos. El estrés genotóxico resultante de la inhibición de la TS y los ciclos de incorporación errónea, escisión e intento de reparación terminan por producir la ruptura del DNA y la muerte celular por apoptosis, sobre todo en células con una alta tasa de división celular (Grem, 1997). El daño en el DNA debido a una incorporación errónea de dUTP es altamente dependiente de los niveles de la dUTPasa pirofosfatasa, que limita la acumulación intracelular de dUTP (Longley et al. 2003). Asimismo, el agotamiento de dTMP da como resultado el agotamiento subsiguiente de dTTP, necesario para la síntesis y reparación del DNA. Los desequilibrios del conjunto de desoxinucleótidos alteran gravemente la síntesis y reparación de ADN, produciendo daños irreparables en el DNA (Longley et al., 2003) (Figura 2.14).

Por otro lado, la incorporación del metabolito metabolito FUTP al RNA produce una alteración de su procesamiento y funcionalidad, resultando esta incorporación tóxica a varios niveles; No solo inhibe el procesamiento del pre-RNA ribosómico (rRNA) al rRNA maduro sino que también interrumpe las modificaciones post-transcripcionales del RNA de transferencia (tRNA) y el montaje y la actividad de los complejos del RNA nuclear pequeño (snRNA) con sus proteínas de unión, lo cual inhibe el empalme del pre RNA mensajero. (Longley et al., 2003). En este sentido, el 5-FU, afecta a la expresión de genes que están involucrados en las modificaciones post-transcripcionales del RNA (Mojardín et al., 2013). Además, todos los RNA que se formen, rRNA, tRNA y snRNA, contienen la base pseudouridina modificada, y se inhibe la poliadenilación del mRNA. Estudios *in vitro* indican que la incorporación aberrante de 5-FU al RNA puede perturbar muchos aspectos del procesamiento del RNA, dando lugar a alteraciones en los niveles proteicos y profundos efectos sobre el metabolismo y la viabilidad celular (Mojardín et al., 2013)

2.4.3. Efectos en médula ósea y Sistema Nervioso Central

Estudios sobre la cinética de la médula ósea tras la administración de 5-FU, muestran una mayor mortalidad celular durante las primeras 24 horas, llegando a recuperarse la viabilidad celular a los 5 días aproximadamente. La celularidad medular alcanza su mínimo a los 3-4 días tras el tratamiento, momento a partir del cual comienza a recuperarse gradualmente, alcanzando la normalidad a los 10-14 días según la (Aispuru et al., 2006b). Coincidiendo en el tiempo con la menor celularidad, el pico máximo de apoptosis se alcanza a los 3-4 días tras la administración de 5-FU, momento a partir del cual comienza a aumentar el índice mitótico que alcanza su máximo entre los días 7 a 10. Efectos similares se han observado en las poblaciones esplénicas y tímicas, así como en leucocitos circulantes, reflejo de lo que acontece en la médula (Aispuru et al., 2006; Aquino et al., 2006; Lettieri et al., 2006).

La neurotoxicidad es un efecto secundario frecuente de los quimioterapéuticos citotóxicos. Estudios *in vitro* han mostrado toxicidad del 5-FU para NSCs en cultivo (Dubois et al., 2014) además de reducción de la neurogénesis en el hipocampo de ratas (ELBeltagy et al., 2012). Se ha asociado el 5-FU con un daño progresivo y retardado a la mielina (Han et al., 2008); también se ha constatado una vulnerabilidad de precursores neuronales y oligodendrocitos a la toxicidad de 5-FU, a pesar de que estos últimos no están en división, sugiriendo que la neurotoxicidad no se limita a las células en división (Dietrich et al., 2006).

2.4.4 5-Fluorouracilo y su potencial uso en ELA

En la ELA, existen evidencias de daño oxidativo a nivel de mRNA desde fases iniciales de la enfermedad, afectando a la traducción y como consecuencia produciéndose una reducción o alteración de la proteína (Chang et al., 2008). En este sentido, estudios muestran como elevados niveles de mRNA no se corresponden con un incremento de proteína, sugiriendo que el RNA se acumula en el interior celular. Cabría por tanto la posibilidad de que el 5-FU redujera la cantidad de RNA transcrito y su acumulación.

El 5-FU también podría estar contrarrestando los efectos patológicos de la inflamación. Como ya se ha comentado, la ELA se caracteriza por un infiltrado de linfocitos en el SNC que interactúan con las células de la glía; esta interacción es dinámica favoreciendo el cambio a un patrón neurotóxico conforme progresa la neurodegeneración. La administración de 5-FU reduce notablemente los niveles de linfocitos circulantes, y, por tanto, podría estar modificando la actividad de la inflamación en el curso de la enfermedad. Además, la eliminación de precursores en la médula y su sustitución por unas células procedentes de progenitores más primitivos y que han sufrido menos ciclos de división también podría resultar beneficioso.

Como se ha comentado con anterioridad, la proteína SOD1 mutada tiende a estar mal plegada y formar agregados. Estos agregados se han documentado tanto en cultivos celulares como en modelos animales y tejidos de pacientes. Se ha sugerido el papel crucial que puede tener el residuo triptófano 32 (W32) en la propagación priónica del plegamiento incorrecto de SOD1 en las células. Varios trabajos han mostrado como la sustitución en SOD1 humana de W32 por serina disminuye significativamente su propensión a la agregación (Grad et al., 2011) y como W32 potencia la agregación y toxicidad de SOD1 mutante en células neuronales (D. Taylor et al., 2007). Por otro lado, estudios han mostrado la capacidad de 5-FU para bloquear la acumulación de la proteína SOD1 mal plegada en células vivas (Pokrishevsky et al., 2018). Este efecto directo sobre el plegamiento aberrante podría ser descrito como un efecto independiente de la diana terapéutica que solo resulta biológicamente significativo cuando se produce el mal plegamiento de la SOD, como en la ELA.

2.4.5. Análogos del 5-Fluorouracilo

Actualmente existen varios fármacos análogos del 5-FU. Uno de ellos es Capecitabina, carbamato de fluoropirimidina (Miwa et al., 1998) de administración oral que produce unos niveles plasmáticos similares a los que se consiguen mediante infusión continua de 5-FU.

Después de la administración oral, la Capecitabina se absorbe como molécula intacta a través del tracto intestinal, evitando así la liberación intraluminal de 5-FU. Posteriormente, es metabolizada secuencialmente al fármaco activo 5-FU mediante un proceso de tres pasos enzimáticos y dos metabolitos intermedios. Primero es hidrolizada a 5'-desoxi-5-fluorocitidina (5'-DFCR) y luego a 5'-desoxi-5-fluorouridina (5'-DFUR) principalmente en el hígado; finalmente, el 5'-DFUR se convierte a 5-FU en los tejidos (figura 2.15) (Desmoulin et al., 2002). Su mecanismo de acción es el mismo que el 5-FU, actúa interfiriendo con la síntesis de RNA y DNA por inhibición de la timidilato sintasa.

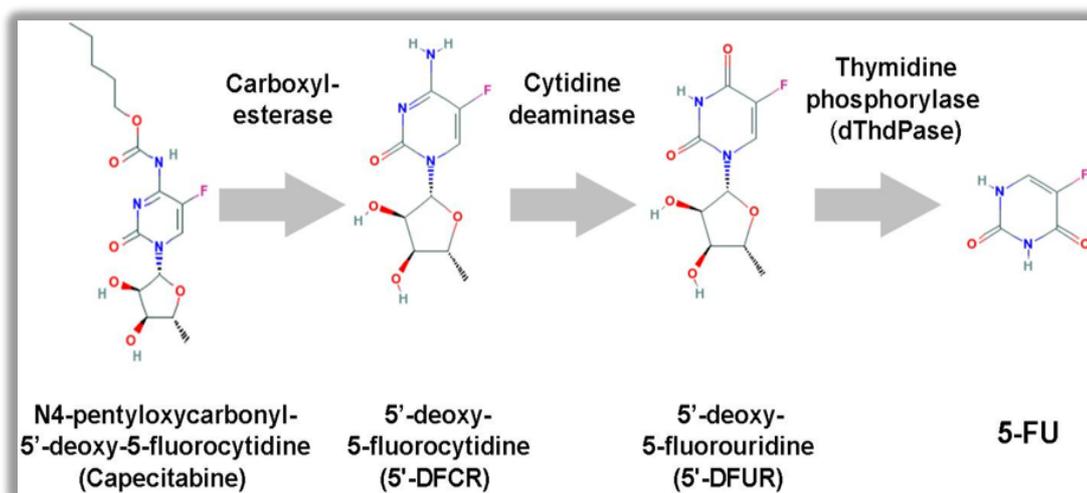


Figura 2.15. Metabolismo de Capecitabina (Miura et al., 2010)

El 5-FU al tener que ser administrado vía parenteral, conlleva el traslado a un centro hospitalario para recibir el tratamiento. Este desplazamiento supone un gran problema tanto de logística como de comodidad para los afectados de ELA. Por el contrario, la Capecitabina, al ser un agente oral, simplifica mucho el tratamiento ya que no es necesario el traslado a un centro hospitalario evitando además las complicaciones y molestias asociadas con la administración intravenosa. Asimismo, presenta menos efectos secundarios que el 5-FU, aunque su eficiencia terapéutica en tratamiento de cáncer es parecida (Cassidy et al., 2002).

Por los prometedores resultados obtenidos con el fármaco 5-Fluorouracilo (Rando et al., 2018) y por las ventajas que encontramos en el reposicionamiento de fármacos, en esta Tesis Doctoral nos hemos centrado en un estudio más profundo del fármaco y su efecto terapéutico.

OBJETIVOS 3

OBJETIVOS

El objetivo general planteado en la presente memoria de Tesis Doctoral es profundizar en el estudio del efecto terapéutico del 5-Fluorouracilo (5-FU) en el Sistema Nervioso Central y músculo esquelético, así como conocer su mecanismo de acción en el modelo animal de Esclerosis Lateral Amiotrófica SOD1G93A.

Para alcanzar este objetivo general, nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

- 1.- Estudiar el efecto de 5-FU en la neuroinflamación en los tejidos más afectados por la enfermedad
- 2.- Estudiar el efecto de 5-FU sobre la expresión de los microRNAs en los tejidos más afectados por la enfermedad.
- 3.- Comprobar la toxicidad de la Capecitabina, profármaco del 5-FU, en el modelo animal de ELA SOD1G93A y la biodisponibilidad de ambos fármacos (5-FU y Capecitabina).
- 4.- Buscar una mayor efectividad del fármaco 5-FU mediante la administración de distintas dosis.
- 5.- Comparar la influencia de diferentes condiciones experimentales en el modelo murino SOD1G93A tras la administración de 5-FU.

MATERIAL Y MÉTODOS 4

MATERIAL Y MÉTODOS

La infraestructura utilizada en el presente trabajo está disponible en el Laboratorio de Genética y Bioquímica (LAGENBIO) y en el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza. A continuación, se describen los materiales y métodos empleados para la consecución de los objetivos propuestos en la presente Tesis Doctoral.

4.1. Modelo murino SOD1G93A -

4.1.1. Aspectos generales

El modelo animal empleado ha sido el ratón transgénico SOD1G93A de alta copia para el gen humano mutado de la superóxido dismutasa (hSOD1), con un cambio de glicina por alanina en el codón 93; con fondo genético de la cepa B6SJL (B6SJL-Tg (SOD1G93A)¹ Gur/J) proveniente de la casa comercial The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA).

La colonia fue mantenida mediante el cruce de machos hemicigóticos portadores del transgén SOD1G93A con hembras híbridas B6SJLF1 (C57BL/6J x SJL/J F1) provenientes de Janvier Labs (Saint-Berthevin Cedex, France). De esta forma, se obtienen ratones hemicigóticos transgénicos que sobreexpresan la hSOD1 mutada y ratones homocigotos sin el transgén, siendo estos últimos los empleados como controles o *wild type* (WT). El diseño experimental se realizó considerando que en cada grupo hubiera hermanos de camada, y balanceando los sexos para tener en cuenta el posible sesgo en función del sexo.

Los animales fueron criados y alojados en dos localizaciones, el Animalario del Servicio General de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de Zaragoza y el animalario del Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA). En esta última localización, parte de los animales empleados fueron cruzados en la zona SPF y otra parte de los animales fueron cruzados y criados en la zona experimental o convencional del animalario. En todas las localizaciones se siguieron las directrices del RD 53/2013, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, y que transpone la directiva europea 2010/63/UE. Los animales tuvieron acceso a comida y bebida *ad libitum* bajo ciclos de luz y oscuridad de 12 horas en unas condiciones ambientales de temperatura (21-23°C) y humedad (55%) controladas. Las condiciones sanitarias fueron controladas mediante análisis bacteriológicos, parasitológicos y serológicos. Todos los

experimentos y ensayos realizados fueron aprobados por la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza (PI31/10, PI18/17).

4.1.2. Genotipado

La identificación de los ratones transgénicos y WT se realizó mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con DNA de muestras de tejido de los animales. El DNA genómico se extrajo mediante la lisis del tejido con NaOH 50mM durante 30 minutos a 98°C, posteriormente se neutralizó la lisis con Tris 1M y se centrifugó a 14000 rpm durante 6 minutos para obtener el sobrenadante que contiene el DNA. A continuación, se realizó la PCR, con la mezcla de sus componentes descrita en la tabla 4.1, para amplificar simultáneamente fragmentos del transgén *hSOD1* mutado y del gen Interleucina 2 (*IL-2*), este último como control endógeno de la reacción. Las condiciones para la PCR fueron las siguientes: 95°C durante 3 minutos (desnaturalización inicial), y 30 ciclos de 95°C, 60°C y 72°C de 30 segundos en cada temperatura, y finalmente se conservó la muestra a 4°C. Los cebadores empleados, cuyas secuencias están mostradas en la Tabla 4.2, fueron descritos anteriormente por Gurney y cols (Gurney et al., 1994). Los productos amplificados se visualizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2% con tinción GelGreen® (Biotium). Los animales no transgénicos o WT presentaron una única banda de 324 pares de bases (gen control *IL-2*), mientras que los animales transgénicos presentaron dos bandas (236 pb y 324 pb) correspondientes con la amplificación del gen *hSOD1* mutado e *IL-2*, respectivamente.

Tabla 4.1. Componentes para la PCR de genotipado.

| Componentes | Volumen (ul) 1X | Casa Comercial |
|--------------------------------|------------------------|-----------------------|
| H ₂ O sin nucleasas | 12 | |
| dNTPS 1.25 mM | 3.2 | Ibian Technologies |
| Buffer 10X | 2 | Ibian Technologies |
| MgCl ₂ 100 mM | 0.4 | Ibian Technologies |
| OIMR042 20 µM | 0.4 | Invitrogen |
| OIMR043 20 µM | 0.4 | Invitrogen |
| OIMR113 20 µM | 0.2 | Invitrogen |
| OIMR114 20 µM | 0.2 | Invitrogen |
| Taq polimerasa (5 U/µl) | 0.2 | Ibian Technologies |
| DNA | 1 | |
| Volumen final | 20 µl | |

Tabla 4.2. Secuencia de los cebadores utilizados para la PCR de genotipado.

| Gen | Cebador | Secuencia |
|---------------------|----------------|---------------------------|
| <i>IL-2</i> | OIMR042 | CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT |
| | OIMR043 | GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC |
| <i>hSOD1</i> | OIMR113 | CATCAGCCCTAATCCATCTGA |
| | OIMR114 | CGCGACTAACAATCAAAGTGA |

4.2. Obtención y procesamiento de muestras biológicas

4.2.1. Extracción de tejidos

Los animales se eutanasiaron mediante inhalación en cámara de CO₂, método aceptado para la eutanasia de pequeños roedores. Posteriormente se disecaron la médula espinal, mediante extrusión hidráulica con PBS estéril, y los dos *Quadriceps femoris*. Cada tejido se dividió en dos partes iguales para el posterior estudio en paralelo de la expresión génica y proteica. Realizar ambos estudios en muestras de los mismos animales reduce los posibles errores debidos a la variabilidad entre animales. Para evitar la degradación de los tejidos, fueron congelados rápidamente en hielo seco y almacenados a -80°C hasta su uso.

4.2.2. Extracción de suero a partir de sangre cardiaca

Las muestras de sangre se obtuvieron mediante punción intracardiaca con una jeringuilla de 1 ml, previa eutanasia de los animales en cámara de CO₂. Se introdujo una aguja de 25G (BD Microlance™) justo debajo del esternón en ángulo aproximado de 45° hasta alcanzar el corazón y se extrajeron 200-500 µl de sangre que fue depositada en un tubo eppendorf sin aditivos. Tras 30 minutos de reposo a temperatura ambiente, se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos y se recogió el suero (sobrenadante) que fue congelado inmediatamente en hielo seco y almacenado a -80°C hasta su posterior uso.

4.3. Administración de 5-Fluorouracilo (5-FU)

El antineoplásico 5-fluorouracilo (Sigma Aldrich) se administró a una concentración de 150 mg por kilo de peso de ratón mediante jeringuillas de insulina de 0,5 ml (BD Micro-Fine™) por vía intraperitoneal. El fármaco se resuspendió a 15mg/ml en suero fisiológico salino justo antes de cada administración. Como control del tratamiento se inyectó suero fisiológico. La pauta de administración y toma de muestras seguida se muestra en la Tabla 4.3. Se hicieron grupos de 1, 2 y 3 administraciones; la toma de muestras comentadas en el apartado 4.2.1 se realizó a los 15, 30 y 45 días respectivamente tras la primera administración.

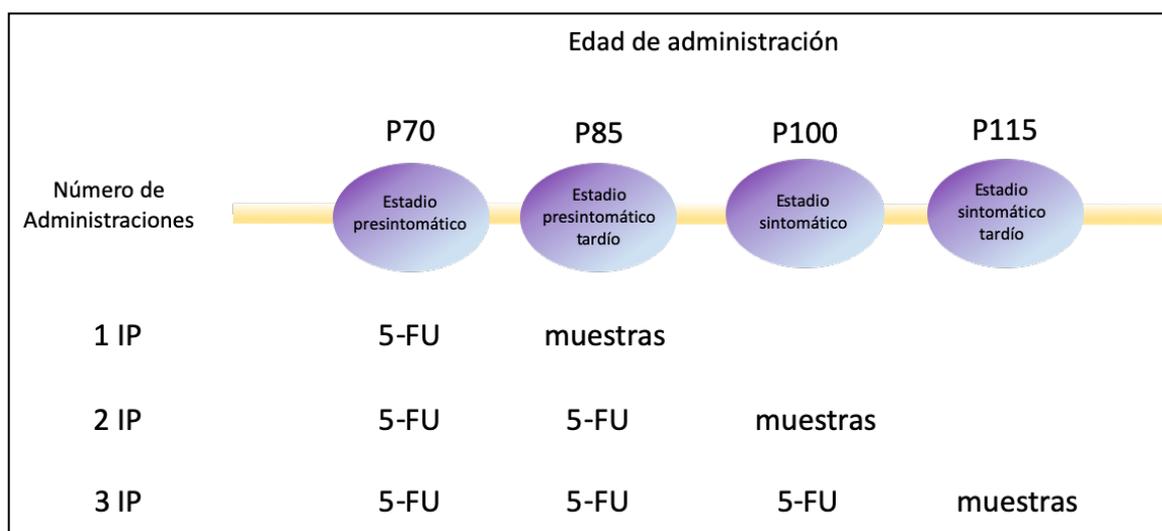


Tabla 4.3. Pauta de administración del 5-FU y toma de muestras en los animales SOD1G93A. Se hicieron grupos de 1, 2 y 3 administraciones intraperitoneales (IP) del fármaco. En todos los grupos el tratamiento comenzó a los 70 días de edad y la administración se realizó una vez cada 15 días.

4.4. Pruebas funcionales

La evaluación del comportamiento motor se realizó mediante las pruebas funcionales de rotarod y campo abierto (Figura 4.1). También se hizo control sobre la evolución del peso y la supervivencia de los animales durante el transcurso de la enfermedad. El registro de las pruebas se hizo siempre por las mañanas y semanalmente, a excepción del test de campo abierto que fue quincenalmente. Para evitar comportamientos anómalos, se comenzó siempre con los machos y después de evaluar cada animal los aparatos se limpiaron en profundidad.

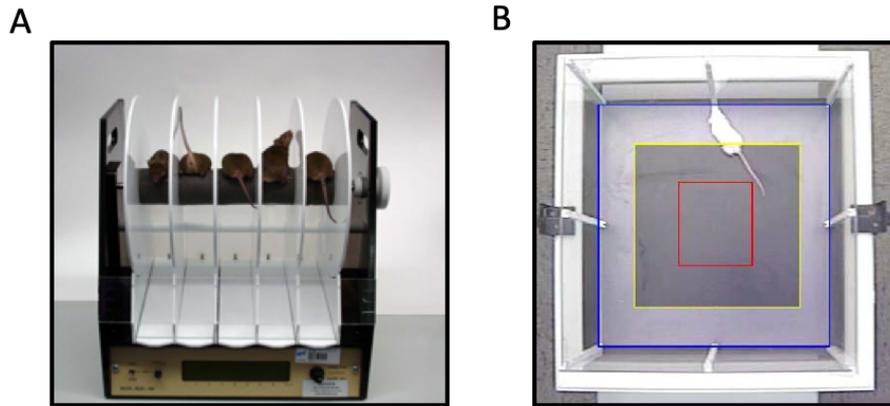


Figura 4.1. **Aparatos utilizados para las pruebas funcionales.** (A) Test de rotarod y (B) Test de campo abierto (open field).

4.4.1. Peso

Debido a que la evolución del peso corporal puede ser indicativo de la progresión de la enfermedad, se registró el peso de los animales semanalmente con una balanza electrónica (VIPER SW 3, Mettler Toledo). En el caso de los test de comportamiento, los animales fueron pesados previo a la realización de las pruebas. Para disminuir el posible efecto del peso inicial entre los animales experimentales se empleó el peso relativo.

4.4.2. Test de rotarod

El test de rotarod permite evaluar la fuerza motora, el equilibrio y la coordinación. El aparato (RotaRod /RS, LE8200, LSI-LETICA Scientific Instruments) (Figura 4.1A) consiste en un cilindro que gira sobre sí mismo a una velocidad constante de 12 rpm; está dividido en 5 compartimentos para evitar así el contacto entre los animales y posibles distracciones. Para el correcto funcionamiento de la prueba, fue necesario entrenar a los ratones una semana antes de comenzar el ensayo para que se familiarizaran con el aparato; se descartaron aquellos animales que a pesar de no tener ninguna dificultad motora no superaron la prueba por nerviosismo o distracción elevada. Cada animal dispuso de tres intentos y se registró el tiempo máximo que fueron capaces de mantenerse en el cilindro sin caer hasta un límite de 180 segundos.

4.4.3. Test de campo abierto (open field)

Otra medida estandarizada para evaluar la actividad locomotora es cuantificar la actividad espontánea en un ambiente novedoso. Por esta razón, se empleó el test de campo abierto (open field). El sistema consiste en una caja de Plexiglás (45 x 45 cm) dividida en varias zonas (Figura 4.1B) y controlada por una cámara situada encima de la caja y conectada a un ordenador. Para el correcto desarrollo de esta prueba se mantuvo una iluminación muy tenue, un ambiente silencioso y se limpió la caja en profundidad tras cada animal para evitar cualquier posible distracción que pudiera interferir en la prueba.

Los animales fueron colocados individualmente en el centro de la caja y, tras 1 minuto de adaptación al entorno, se registró su actividad durante los siguientes 5 minutos. La determinación automática de la actividad de cada ratón se registró mediante el sistema de seguimiento (tracking) de video SMART 3.0 (Panlab, Harvad Bioscience). Se registró y analizó la distancia total y la distancia centro (en zona central) recorrida por cada ratón.

4.4.4. Supervivencia

La monitorización individual de cada ratón se realizó con una frecuencia de tres veces por semana desde los 100 días de edad hasta su punto final. Debido a la severidad de este modelo animal que termina con parálisis total, situación que es incompatible con el bienestar animal, y siguiendo las recomendaciones internacionales, se fijó como fecha de fin de procedimiento y punto final humanitario aquella en la que el animal una vez colocado en posición decúbito, no es capaz de darse la vuelta por sí mismo en los primeros treinta segundos. Una vez llegados a este punto, se eutanasiaron en cámara de CO₂.

4.5. Estudio de la expresión génica

4.5.1. Extracción de RNA

La extracción de RNA de cuádriceps y médula espinal de los animales se realizó siguiendo la misma metodología para ambos tejidos. En primer lugar, a tubos eppendorf de seguridad de 2 ml (Sigma) se les añadió una bola de acero, 0.5 ml de QiAzol Lysis Reagent (Qiagen) y el tejido congelado. A continuación, las muestras se homogeneizaron con el aparato Tissue Lyser LT

(Qiagen) a una frecuencia de 50Hz y un tiempo variable (1-2 ciclos de 2 minutos) en función del tejido hasta que la homogeneización fue completa. Posteriormente, se centrifugó a 12000 g durante 1 minuto y se transfirieron 0.45 ml del sobrenadante a un nuevo tubo donde el RNA fue purificado mediante el kit Direct-zol™ RNA miniprep (R2052, Zymo Research), basado en un sistema de extracción y purificación mediante columnas, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron eluidas en 50 µl de agua libre de RNAsas. Una vez obtenido el RNA, se valoró su calidad en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific). Los ratios asumidos para considerar las muestras libres de contaminación fueron A260/280 - 2.0 y A260/A230 >1.8. Por último, las muestras se congelaron a -80°C hasta su uso.

4.5.2. Retrotranscripción (RT)

Una vez comprobada la calidad de las muestras, se cuantificó la concentración de RNA en cada muestra en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific). Se sintetizó DNA complementario (cDNA) a partir de 200 ng de RNA de cada muestra por medio del kit qScript™ cDNA SuperMix (Quanta Biosciences), basado en una mezcla de oligo (dT) y cebadores aleatorios, siguiendo las instrucciones del fabricante. El cDNA obtenido se almacenó a -20°C hasta su uso.

4.5.3. PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)

Esta técnica permite amplificar y cuantificar simultáneamente el cDNA objeto de estudio. El método usado está basado en la cuantificación de la señal emitida por fluoróforos unidos a sondas específicas o complementarias a los fragmentos de cDNA de interés. La cantidad de fluorescencia emitida es directamente proporcional al número de copias del fragmento amplificado; de este modo, se visualiza la cantidad de cDNA amplificada en cada ciclo pudiendo conocer la cantidad relativa de cDNA presente en la muestra tras normalizarla con genes de referencia o housekeeping.

Se emplearon sondas TaqMan® (Applied Biosystems) que son oligonucleótidos modificados que emiten fluorescencia cuando hibridan con el cDNA específico. Las sondas empleadas aparecen citadas en la Tabla 4.4. Las reacciones se realizaron por triplicado en un volumen final de 5µl, compuesto por 2.5 µl de TaqMan® Universal PCR Fast Master Mix (No AmpErase® UNG, Applied Biosystems), 0.5 µl de la sonda Taqman para cada gen y 2 µl de cDNA diluido 1:10 en agua tratada con Dietilpirocarbonato (DEPC). Las reacciones se hicieron mediante

el aparato Step One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Como genes endógenos housekeeping se utilizaron Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*Gapdh*) y β -actina (*Actb*). Se seleccionaron estos genes normalizadores basándonos en estudios previos de nuestro laboratorio, en función del tipo de tejido, para nuestro modelo animal (Calvo et al., 2008).

Para la normalización de las muestras, al valor medio del umbral de ciclo (Ct) de las tres replicas de cada muestra a estudio se le restó el Ct promedio de los genes endógenos (Δ CT). Posteriormente, se calculó el valor medio Δ Ct de cada grupo y se le restó el valor medio Δ Ct del grupo control ($\Delta\Delta$ CT). El proceso exponencial fue convertido a comparación lineal relativa mediante la conversión por $2^{-\Delta\Delta$ CT}. El grupo control (no tratado) fue usado en cada comparación como calibrador ($\Delta\Delta$ CT=0; $2^{-\Delta\Delta$ CT=1). Los valores se expresaron como medias y los valores de error positivos y negativos (barras de error) fueron calculados usando el método $2^{-\Delta\Delta$ CT (Livak & Schmittgen, 2001).

Tabla 4.4. Sondas TaqMan empleadas para PCR cuantitativa a tiempo real.

| Sonda Taqman | Referencia |
|--------------------|----------------|
| <i>Pycard/Asc</i> | Mm00445747_g1 |
| <i>Casp1</i> | Mm00438023_m1 |
| <i>Il1b</i> | Mm00434228_m1 |
| <i>Gapdh</i> | 4352932E |
| <i>Actb</i> | 4352933E |
| <i>Nlrp3</i> | Mm00840904_m1 |
| <i>Itgam/Cd11b</i> | Mm00434455_m1 |
| <i>Cx3cr1</i> | Mm004138354_m1 |
| <i>Ccr2</i> | Mm01216173_m1 |
| <i>Cxcr4</i> | Mm01996749_s1 |
| <i>Ccl2</i> | Mm00441242_m1 |

4.6. Estudio de la expresión de MicroRNA (miRNA)

4.6.1. miRNA retrotranscripción (RT)

Como se ha comentado en el apartado 4.5.1, previamente se comprobó la calidad de las muestras y se cuantificó la concentración de RNA en cada muestra mediante el uso del espectrofotómetro Nanodrop NS- 1000 (Thermo Scientific). De cada muestra, se sintetizó cDNA a partir de 30 ng de RNA con el kit TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit TaqMan® Advanced miRNA cDNA Synthesis (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante. El protocolo estándar de ensayos de microRNA TaqMan® requiere una reacción de retrotranscripción individual para cada miRNA de interés (Tabla 4.5), por lo que para facilitar la síntesis de miR-cDNA, se realizó un paso de RT multiplexado que incluía los cebadores de RT individuales que se prepararon según las instrucciones del fabricante (Life Technologies). El cDNA resultante se almacenó a -20°C hasta su uso.

4.6.2. PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) para miRNA

Para la amplificación y cuantificación de los miRNAs de interés se emplearon sondas Taqman MicroRNA assays (Thermofisher) descritas en la tabla 4.5. Las reacciones se hicieron por triplicado en un volumen final de 5 µl compuesto por 2.5 µl de TaqMan® Universal PCR Fast Master Mix (No AmpErase® UNG, Applied Biosystems), 0.25 µl de la sonda para cada microRNA de interés y 2.25 µl de cDNA previamente diluido 1:7 en agua DEPC. Las reacciones se realizaron mediante el aparato Step One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

Como housekeeping se emplearon los RNAs pequeños nucleares snoRNA202 (Snord68) y snoRNA234 (Snord70), recomendados por la casa comercial, cuya media geométrica se utilizó para la normalización de la expresión de los miRNAs estudiados. El proceso de normalización de las muestras es el seguido en el apartado 4.5.3.

Tabla 4.5. Ensayos TaqMan utilizadas para expresión de miRNA.

| Nombre | Assay ID | Número miRBASE | Secuencia madura |
|--------------------|----------|----------------|---|
| snoRNA234 | 001234 | AF357329 | CTTTTGGAACTGAATCTAAGTGATTTAACA AAAATTCGTCCTACTACCACTGAGA |
| snoRNA202 | 001232 | AF357327 | GCTGTACTGACTTGATGAAAGTACTTTTGA ACCCTTTTCCATCTGATG |
| miR-21-5p | 000397 | MIMAT0000530 | UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA |
| miR-206-3p | 000510 | MIMAT0000239 | UGGAAUGUAAGGAAGUGUGUGG |
| miR-155-5p | 002571 | MIMAT0000165 | UUA AUGCUAAUUGUGAUAGGGGU |
| miR-132-3p | 000457 | MIMAT0000144 | UAACAGUCUACAGCCAUGGUCG |
| miR-223-3p | 002295 | MIMAT0000665 | UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCA |
| miR-146a-5p | 000468 | MIMAT0000158 | UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU |
| miR-124-3p | 001182 | MIMAT0000134 | UAAGGCACGCGGUGAAUGCC |
| miR-9-5p | 000583 | MIMAT0000142 | UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA |

4.7 Estudio de la expresión proteica

4.7.1. Extracción y cuantificación proteica

Los tejidos de cuádriceps y médula espinal, previamente diseccionados y conservados a -80°C , fueron homogeneizados en buffer de lisis RIPA (Tabla 4.6) con antiproteasas (Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche) mediante el aparato TissueLyser LT (Qiagen), permaneciendo en frío durante al menos 30 minutos. Tras este tiempo, se centrifugaron las muestras a 10000 g durante 10 minutos a 4°C para posteriormente recoger el sobrenadante con la fracción proteica.

La concentración proteica presente en las muestras se cuantificó mediante el método colorimétrico BCA . (B9643, C2284, Sigma), basado en la reducción del Cu^{2+} a Cu^{+} por parte de los enlaces peptídicos de las proteínas cuando se encuentran en un medio alcalino. El Cu^{+} producido reacciona con el BCA, que absorbe a 562nm. Esta absorbancia se midió en un espectrofotómetro (Infinite F200, Tecan Ibérica Instrumentación) y es proporcional a la concentración de proteína.

Esta técnica se realiza para poder cargar la misma cantidad de proteína de las muestras en el western blot.

Tabla 4.6. Componentes RIPA buffer.

| Compuesto | Cantidad |
|-----------------------|----------|
| 150mM NaCl | 0.438 g |
| 50mM Tris-HCl | 0.303 g |
| 1% Deoxicolato sódico | 0.5 g |
| 0.1% SDS | 0.005 g |
| 1% Tritón X-100 | 0.5 ml |
| H ₂ O mQ | 50 ml |

4.7.2. Electroforesis e inmunodetección

Se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) con el fin de separar las proteínas en función de su peso molecular. Para ello, primero se desnaturalizaron las muestras en buffer Laemmli 4x a 98°C durante 5 minutos. Después de conseguir la linealización de las proteínas, se cargó 25 µg de proteína total en cada pocillo y se resolvieron en un gel de acrilamida al 5-10%. La composición de las soluciones y geles de acrilamida empleados para la realización del western blot se detallan en la tabla 4.7 y 4.8 respectivamente.

En la electroforesis, la separación de las proteínas se produce al aplicar un voltaje constante. En este caso, se realizó a 120 V y a temperatura ambiente. Además, se añadió el marcador de peso molecular Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad) para facilitar la identificación correcta de las proteínas objeto de estudio. Por último, se transfirieron las proteínas del gel a una membrana de fluoruro de polivinilideno (Amersham Hybond™-P, GE) mediante una transferencia húmeda con montaje tipo sándwich con unas condiciones de 4°C, 100V durante 1 h.

Tabla 4.7. Composición de las soluciones utilizadas para la realización del western blot.

| Soluciones | Composición |
|-------------------------------|--|
| Buffer de electroforesis 10x | 30.27 g de Tris-base, 144.27 g de glicina, 10 g de SDS, 1 l H ₂ O, pH 8.3 |
| Buffer de electroforesis 1x | 100 ml de buffer electroforesis 10x, 900 ml H ₂ O |
| Buffer de gel resolvidor 4X | 1.5 M Tris-base pH 8.8 |
| Buffer de gel concentrador 4X | 0.5 M Tris-base pH 6.8 |
| Buffer de transferencia | 50 ml de Tris-glicina 20x, 200 ml de metanol, 750 ml de H ₂ O |
| Buffer Laemmli 4X | 2.5 ml de Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, 2.5 ml de SDS 10%, 2.5 ml de 2-Mercaptoetanol, 2.5 ml de glicerol, 1 mg de azul de bromofenol |
| TBS 10X | 24.23 g de Tris-base, 87.75 g de NaCl, 1 l de H ₂ O, pH 7.5 |
| TTBS 1X | 100 ml de TBS 10x, 900 ml de H ₂ O, 1 ml de Tween-20 |
| Tris-glicina 20x | 29.07 g de Tris-base, 144.13 g de glicina, 1 l de H ₂ O |
| Stripping | 0.985 g de Tris-HCl pH 6.7, 2 g de SDS, 100 ml H ₂ O |

Tabla 4.8. Composición geles de acrilamida.

| | Gel resolvidor (10%) | Gel concentrador (5%) |
|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| H ₂ O miliQ (ml) | 4.9 | 6.15 |
| Buffer 4X (ml) | 2.5 | 2.15 |
| Acrilamida 40% (ml) | 2.5 | 1.25 |
| ¹ SDS 10% (ul) | 100 | 100 |
| ² TEMED (ul) | 15 | 15 |
| ³ APS 10% (ul) | 30 | 30 |

¹SDS, dodecilsulfato sódico; ²TEMED, tetrametiletildiamina; ³APS, persulfato amónico.

Para la inmunodetección de las proteínas, primero se bloquearon los sitios inespecíficos de las membranas con una solución de TTBS 1X con BSA al 5%, en agitación a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras el bloqueo, se incubaron las membranas en agitación a 4°C durante toda la noche con el anticuerpo primario específico para cada proteína en un 1% de BSA en TTBS 1X. Al día siguiente, tras 3 lavados de 10 minutos con TTBS para eliminar el exceso de anticuerpo no hibridado, se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con HRP (Horseradish Peroxidase) en agitación, durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios y secundarios empleados se muestran en la Tabla 4.9. Finalmente, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TTBS y se llevó a cabo la inmunodetección añadiendo a la membrana el sustrato quimioluminiscente Immobilon® Crescendo Western HRP Substrate (Millipore). Las membranas se visualizaron mediante el equipo Molecular Imager® VersaDoc™ MP 4000 System (Bio-Rad) y se realizó el análisis densitométrico de las bandas obtenidas con el programa AlphaEase FC (Bonsai). La normalización de los datos obtenidos se realizó dividiendo las intensidades ópticas de cada proteína a estudio entre las de la proteína GAPDH.

Tabla 4.9. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en western blot.

| | Anticuerpo | PM* (KDa) | Dilución | Referencia |
|-----------|----------------------|------------------|-----------------|--------------------------------------|
| | NLRP3 | 106 | 1:250 | sc-66846, Santa Cruz Biotechnology |
| | CASPASA-1 | 20,45 | 1:250 | sc-1218-R, SantaCruz Biotechnology |
| 1º | IL1B | 17,31 | 1:250 | sc-7884, Santa Cruz Biotechnology |
| | ASC | 24 | 1:250 | sc-22514-R, Santa Cruz Biotechnology |
| | GAPDH | 37 | 1:1000 | PK-AB718-3781, Promokine |
| 2º | goat anti-Rabbit IgG | - | 1:3000 | 31466, Thermo Fisher Scientific |

*Peso molecular en kiloDaltons

4.8. Ensayos de 5-Fluorouracilo y Capecitabina

4.8.1 Estudio de distintas dosis de 5-Fluorouracilo

Se realizó un estudio piloto de efectividad del fármaco 5-FU (Sigma Aldrich) con administración de diferentes dosis en 36 machos transgénicos. Se hicieron 4 grupos: control (n=7), 200 mg/kg (n=10), 150 mg/kg (n=9) y 100 mg/kg (n=10) de 5-FU. El fármaco se resuspendió (15mg/ml) en suero salino fisiológico justo antes de cada administración. Al grupo control se le administró suero salino fisiológico. La pauta de administración comenzó a los 70 días de edad y se realizó una inyección intraperitoneal cada 15 días siendo un total de tres administraciones. Se realizó un estudio de supervivencia y evolución del peso.

4.8.2. Ensayo farmacocinético de Capecitabina y 5-Fluorouracilo

El estudio de absorción de los fármacos 5-FU y Capecitabina se realizó en animales WT a diferentes tiempos. Para ello, a un grupo se le administró una dosis de 150 mg/kg de 5-FU vía intraperitoneal mediante una jeringuilla de insulina (BD Micro-Fine™ +); al otro grupo, se le administró el fármaco Capecitabina (HY-B0016, CliniSciences) a una concentración de 414 mg/kg (dosis equimolar a la de a 5-FU) por vía oral mediante sonda gástrica 20G/30mm (Fine Science Tools). Posteriormente, y previa eutanasia de los animales, se tomó sangre cardíaca a distintos tiempos para obtener el suero siguiendo el protocolo descrito en el apartado 4.4.2. Las muestras se congelaron rápidamente en hielo seco y almacenaron a -80°C hasta su posterior uso. La detección de los fármacos se realizó por el grupo de Tecnología Química de la Separación y Detección del Instituto de Carboquímica ICB-CSIC (IP: Dra Eva Galvez Buerba), mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Para el análisis de las muestras, primero se añadió 100 µl de suero a 100 µl de metanol y se homogeneizó en un vórtex durante 3 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 1400 rpm durante 10 min y se purificó el sobrenadante con un filtro de 0.45 µm. El análisis se realizó en un cromatógrafo LC-2000 plus con bomba cuaternaria, inyector automático y detector UV (Jasco). Se empleó un gradiente con diferentes concentraciones de agua/metanol. Durante los 12 primeros minutos se empleó un flujo de 0.5 ml/min y 100% de agua. Después, hasta el minuto 26, la proporción fue 30/70 % de agua/metanol; hasta el minuto 32 el flujo fue de 1ml/min con 100% de agua. A partir de ese momento, se restablecieron las condiciones iniciales hasta el minuto 35. La detección del 5-FU se realizó a 266 nm hasta el minuto 22 y a partir de ahí, se midió a 245nm para detectar la

Capecitabina. Se emplearon un total de 20 animales WT para el 5-FU (1 control y 3 animales administrados para cada tiempo) y 20 animales WT para la Capecitabina (1 control y 3 animales administrados para cada tiempo).

4.8.3. Ensayo de toxicidad de Capecitabina

La Capecitabina (HY-B0016, CliniSciences) se administró a una concentración de 414 mg de kilo de peso de ratón (dosis equimolar a la de 150 mg/kg de 5-FU) por vía oral mediante una sonda gástrica 20G/30mm (Fine Science Tools). El fármaco se resuspendió en una solución de buffer citrato con 5% goma arábica (Sigma) justo antes de cada administración. Al igual que con el 5-FU, el tratamiento comenzó a los 70 días de edad y la administración se realizó una vez cada 15 días realizando un total de 3 administraciones. Como control se administró una solución de buffer citrato con 5% goma arábica. Se realizó una vigilancia de una posible toxicidad del fármaco y un estudio de supervivencia. En el ensayo se emplearon un total de 17 ratones: 8 controles (5 machos y 3 hembras) y 9 tratados (7 machos y 2 hembras).

4.8.4. Ensayo de detección de 5-FU en tejidos

Para este estudio se emplearon un total de 6 ratones WT (1 Control y 3 tratados con 5-FU) y 5 ratones transgénicos (1 Control y 4 tratados con 5-FU). Se realizaron un total de 3 administraciones del fármaco por vía intraperitoneal a una concentración de 150mg/kg a la edad de 70, 85 y 100 días. A las 2 horas tras la última administración (P100), se obtuvieron diferentes muestras: hígado, cuádriceps, médula espinal y suero *que* fueron congeladas en hielo seco hasta su almacenamiento a -80°C. Posteriormente, las muestras se homogeneizaron en PBS frío con el aparato Tissue Lyser LT (Qiagen) a una frecuencia de 50Hz y un tiempo variable en función del tejido hasta que la homogeneización fue completa. A continuación, las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 10000 rpm, se recogió el sobrenadante y se purificó mediante una columna Vivaspin 500 (Sigma) a 5000 rpm durante 30 minutos. Por último, se recogió el eluido y se almacenó a -80°C hasta su posterior uso. La detección del fármaco fue realizada por la empresa SAILab (Barcelona) mediante un sistema HPLC 1200 SL (Agilent) conectado a un espectrómetro de masas ABSCIEX QTRAP® 3200 (Sciex).

4.9. Análisis de datos y estadístico

Para el análisis de los datos obtenidos en la presente tesis doctoral se precisó el uso de los siguientes programas:

- StepOne™ software v2.0 (Applied Biosystems): análisis de secuencias y productos amplificados por la qPCR.
- AlphaEase®FC (Alpha Innotech): análisis densitométrico de las bandas del Western Blot.
- GraphPad Prism Software (version 5, La Jolla, CA): elaboración de gráficas.
- SPSS v20.0 (IBM): análisis estadístico.

En primer lugar, se comprobó la normalidad de las muestras mediante el test de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de varianzas mediante el test de Levene. Posteriormente, para comparar las medias de variables cuantitativas se emplearon las pruebas t de Student o U de Mann-Whitney en función de la normalidad de las muestras. Por otro lado, cuando el número de medias a comparar fue igual o mayor de 3 se empleó la prueba de ANOVA y como test post hoc Bonferroni o Games-Howell, en función de la homogeneidad de varianzas. Los valores se expresaron como medias y las barras de error representan el error estándar de la media (SEM). Las curvas de supervivencia se calcularon mediante el análisis de Kaplan-Meier y la prueba de Log-Rank. El umbral de significación estadística para todos los test realizados se estableció en $p < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN 5

CAPÍTULO 1

Efecto del 5-Fluorouracilo en la neuroinflamación en
animales SOD1G93A

1.- Efecto del 5-Fluorouracilo en la neuroinflamación en animales SOD1G93A

La Esclerosis Lateral Amiotrófica es una patología en la que participan tanto células neuronales como no neuronales, existiendo una fuerte interacción entre ellos (Jara et al., 2017). Está constatada la activación de una respuesta neuroinflamatoria desde estadios tempranos de la enfermedad por lo que estos procesos inflamatorios y las células no neuronales podrían tener un papel clave en el daño neuronal y la progresión de la enfermedad (Beers & Appel, 2019). Por tanto, uno de nuestros objetivos fue investigar el efecto que podría ejercer la administración de 5-Fluorouracilo sobre el proceso inflamatorio que se produce durante el transcurso de la neurodegeneración.

El estudio comenzó a los 70 días de edad de los ratones, momento en el que se inició el tratamiento con 5-FU. Se emplearon machos SOD1G93A debido a que presentan una sintomatología más temprana, progresión más rápida y menor esperanza de vida. Se diseñaron grupos de animales que recibieron una o tres administraciones y posteriormente, fueron sacrificados a los 15 días post administración (ver 4.3 de material y métodos). Con esta pauta temporal, los diferentes grupos representan dos estadios diferenciados de la enfermedad, presintomático tardío (P85) y sintomático tardío (P115). De este modo, pudimos analizar la evolución de la expresión génica y proteica de genes relacionados con la inflamación a lo largo de la enfermedad, además del posible efecto del 5-FU sobre dicha expresión. Nos centramos en dos de los tejidos más afectados por la enfermedad, médula espinal y músculo esquelético.

Numerosos estudios han demostrado una activación del inflammasoma NLRP3 en animales SOD1G93A respecto de los WT. En consecuencia, en este estudio al no emplear animales WT asumimos que se produce una activación del inflammasoma en nuestros animales. Por tanto, nos interesó conocer en qué estado de actividad se encontraba el inflammasoma NLRP3 tras el tratamiento con 5-FU ya que es un mediador de la neuroinflamación y parece tener un papel en la patogenia de la ELA. estudios han corroborado su activación en cerebro y tálamo anterior en diferentes modelos de ELA (Bellezza et al., 2018a; Debye et al., 2018; Gugliandolo et al., 2018) e incluso en astrocitos de pacientes (Johann et al., 2015). Por tanto, estudiamos la expresión génica y proteica de los componentes del inflammasoma NLRP3 en nuestros dos tejidos de interés, médula espinal y cuádriceps.

1.1.- Expresión del inflammasoma NLRP3 en cuádriceps de animales SOD1G93A

Primero, quisimos comprobar el estado de activación del inflammasoma NLRP3 en cuádriceps en nuestro modelo animal. Como se ilustra en la Figura 5.1, a nivel de expresión génica se observó un decremento significativo en *Asc/Pycard* ($p=0,023$) y *Caspasa 1* ($p=0,046$) y muy significativo en *IL1b* ($p=0,007$) en la etapa más tardía de la enfermedad. Curiosamente, no observamos cambios significativos en los niveles de *Nlrp3*.

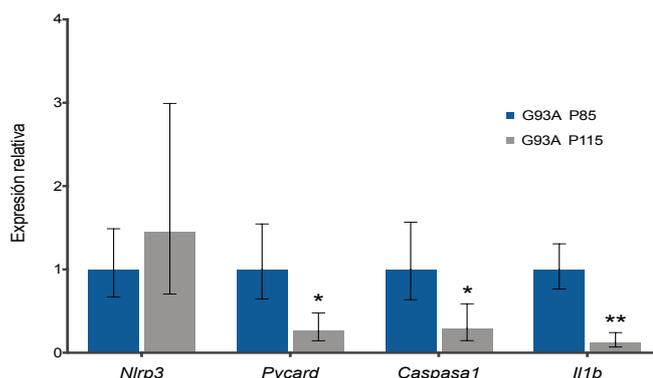


Figura 5.1. Estudio génico del inflammasoma NLRP3 en cuádriceps de animales SOD1G93A a lo largo de la patología. Los datos están referidos al estadio P85 (tomado como 1) y se muestran como media \pm error; t-student * $p<0,05$, ** $p<0,01$

El efecto del 5-FU sobre este complejo fue estudiado en los dos estadios, P85 y P115 (Figura 5.2). Si observamos su efecto en la expresión génica (Figura 5.2A y 5.2B), en ninguno de los estadios analizados se observaron diferencias entre los animales SOD1G93A tratados y los no tratados, aunque en general, se observó una tendencia no significativa hacia la sobreexpresión de los componentes del inflammasoma en los animales tratados.

Los perfiles proteicos del estadio presintomático tardío (Figura 5.2C) revelaron una situación similar a lo ocurrido en la expresión génica, ya que los ratones tratados mostraron una tendencia general hacia la sobreexpresión, existiendo en este caso diferencias significativas en el precursor de CASPASA1 ($p=0,016$); sin embargo, este aumento no se tradujo en una activación de IL1B por lo que la actividad del inflammasoma parece que no está activada en P85. Una situación inversa se observó en el estadio sintomático tardío (Figura 5.2D), donde los animales tratados mostraron menor expresión proteica del inflammasoma, existiendo diferencias significativas en el precursor IL1B ($p=0,015$) y muy significativas en NLRP3 ($p=0,002$).

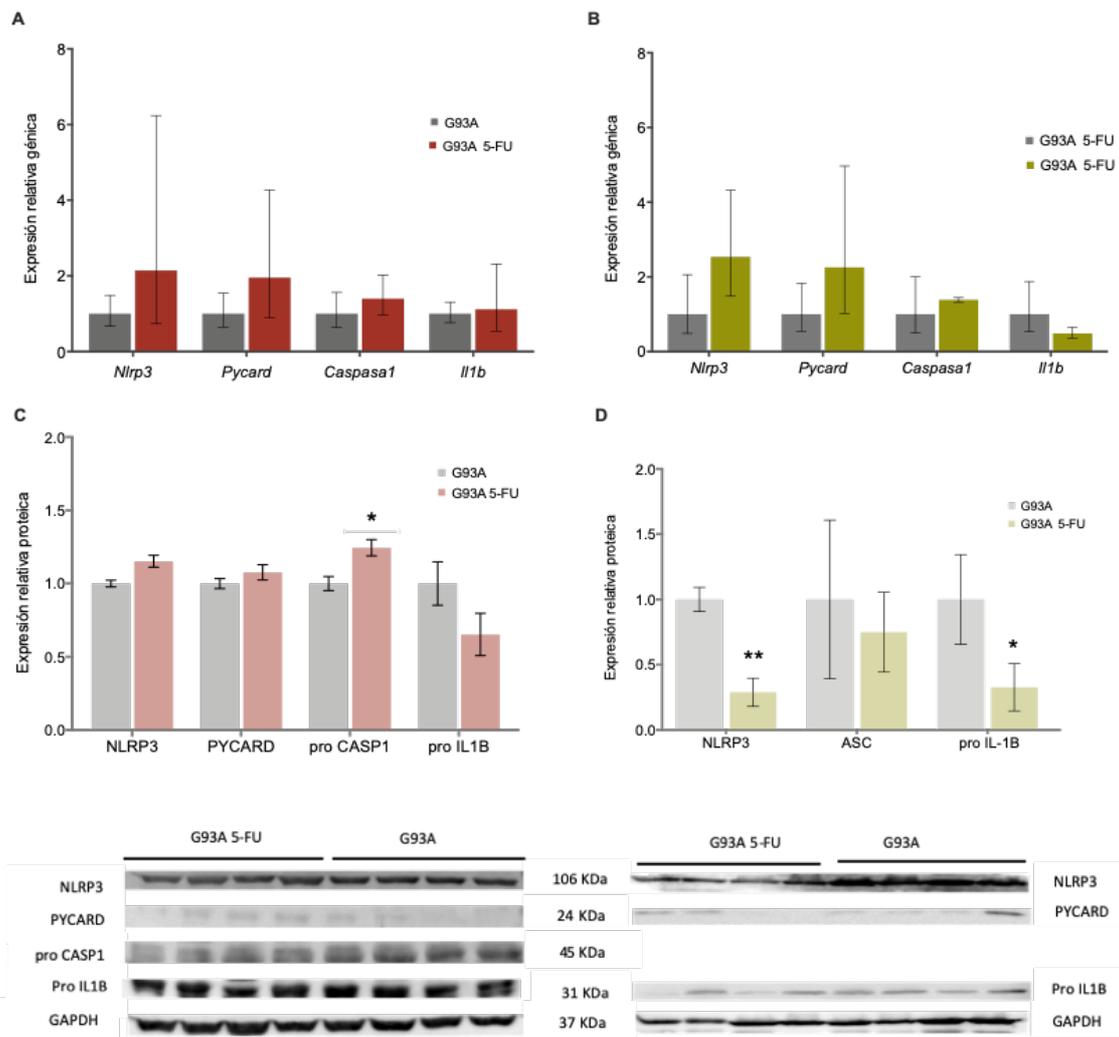


Figura 5.2. Estudio del inflammasoma NLRP3 en cuádriceps en animales SOD1G93A tratados con 5-FU (150 mg/kg) y sus controles a lo largo de la patología. Perfil de expresión génica en estadio (A) presintomático tardío P85 y (B) sintomático tardío P115. Los datos se muestran como expresión relativa media \pm error. Perfil de expresión proteica en estadio (C) presintomático tardío P85 y (D) sintomático tardío P115. Las bandas obtenidas se muestran debajo de los paneles correspondientes. Los datos se muestran como expresión relativa media \pm SEM. En todos los casos los datos están referidos al grupo control G93A (tomado como 1); t student, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. n = 4 animales/grupo.

Por tanto, en cuádriceps los perfiles génicos y proteicos fueron similares en el estadio presintomático, encontrándose elevados los componentes del inflammasoma en los animales tratados, excepto IL1B que mostró menor expresión proteica. Por el contrario, conforme progresa la neurodegeneración y se realizan todas las administraciones del 5-FU, es decir, en el estadio sintomático tardío, los perfiles génicos y proteicos difieren entre sí, produciéndose menor expresión proteica del inflammasoma sobre todo de NLRP3 y del precursor IL1B. Estos datos sugieren que el 5-FU tal vez pudiera modular la activación tardía de NLRP3 en músculo y su

posterior cascada inflamatoria, pudiendo en parte minimizar o contrarrestar el proceso inflamatorio que sucede en la neurodegeneración.

Tras observar el efecto del antineoplásico en el actor principal del inflamasoma, que es NLRP3, también nos interesó conocer su efecto sobre médula espinal, otro de los tejidos más afectados en la enfermedad.

1.2. Expresión del inflamasoma NLRP3 en médula espinal de animales SOD1G93A

Al igual que con el músculo esquelético, quisimos corroborar el estado de activación del inflamasoma NLRP3 en nuestro modelo en médula espinal. Como se observa en la Figura 5.3, en la etapa sintomática tardía se encontraron dos componentes incrementados comparados con el estado anterior, observándose diferencias significativas en *Nlrp3* ($p=0,046$) y muy significativas en *Casp1* ($p=0,001$), aunque estos mayores niveles no se tradujeron en un aumento de *Il1b*, última efectora del inflamasoma.

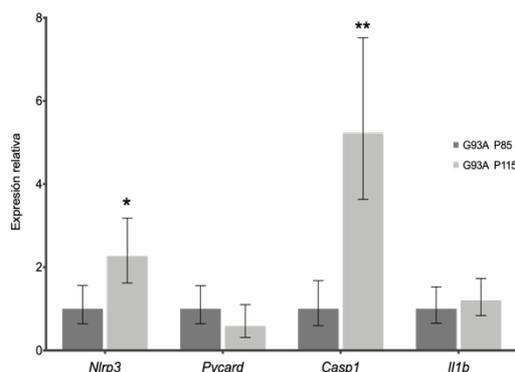


Figura 5.3. Estudio génico del inflamasoma NLRP3 en médula espinal de animales SOD1G93A a lo largo de la patología. Los datos están referidos al estadio P85 (tomado como 1) y se muestran como media \pm error. t-student, * $p<0,05$, ** $p<0,01$. $n=4-5$ animales/grupo.

Tras estos resultados, quisimos conocer el efecto que la aplicación del tratamiento con 5-FU tenía sobre la expresión génica y proteica de los componentes del inflamasoma en los diferentes estadios, presintomático tardío P85 y sintomático tardío P115 (Figura 5.4). Si observamos su efecto en la expresión génica (Figura 5.4A y 5.4B), en ninguno de los estadios analizados se observaron diferencias entre los animales tratados y sus controles, aunque en la etapa sintomática tardía se observó una tendencia para la disminución en *Nlrp3* ($p=0,076$) (Figura 5.4B).

En los perfiles proteicos del estadio presintomático (Figura 5.4C), no se detectaron cambios entre el grupo tratado y el control, sugiriendo de este modo que la actividad del inflamasoma no se encuentra alterada en P85. Por el contrario, en el estadio sintomático tardío (Figura 5.4D), el 5-FU disminuyó significativamente la expresión de NLRP3 ($p=0,049$), hecho que fue acompañado

de una tendencia de aumento en el adaptador ASC/PYCARD ($p=0,085$) y una tendencia a la disminución del precursor CASP1. En este estadio, a pesar de las numerosas pruebas realizadas, no se observó expresión proteica de la forma madura de CASP1, tal vez por limitaciones en la técnica o por encontrarse niveles muy disminuidos de la proteína. Estos datos demuestran que el tratamiento con el 5-FU en estadios finales disminuye la expresión de NLRP3 y, al ser el componente principal del inflammasoma, posiblemente influya en dicho mecanismo disminuyéndolo en los animales tratados.

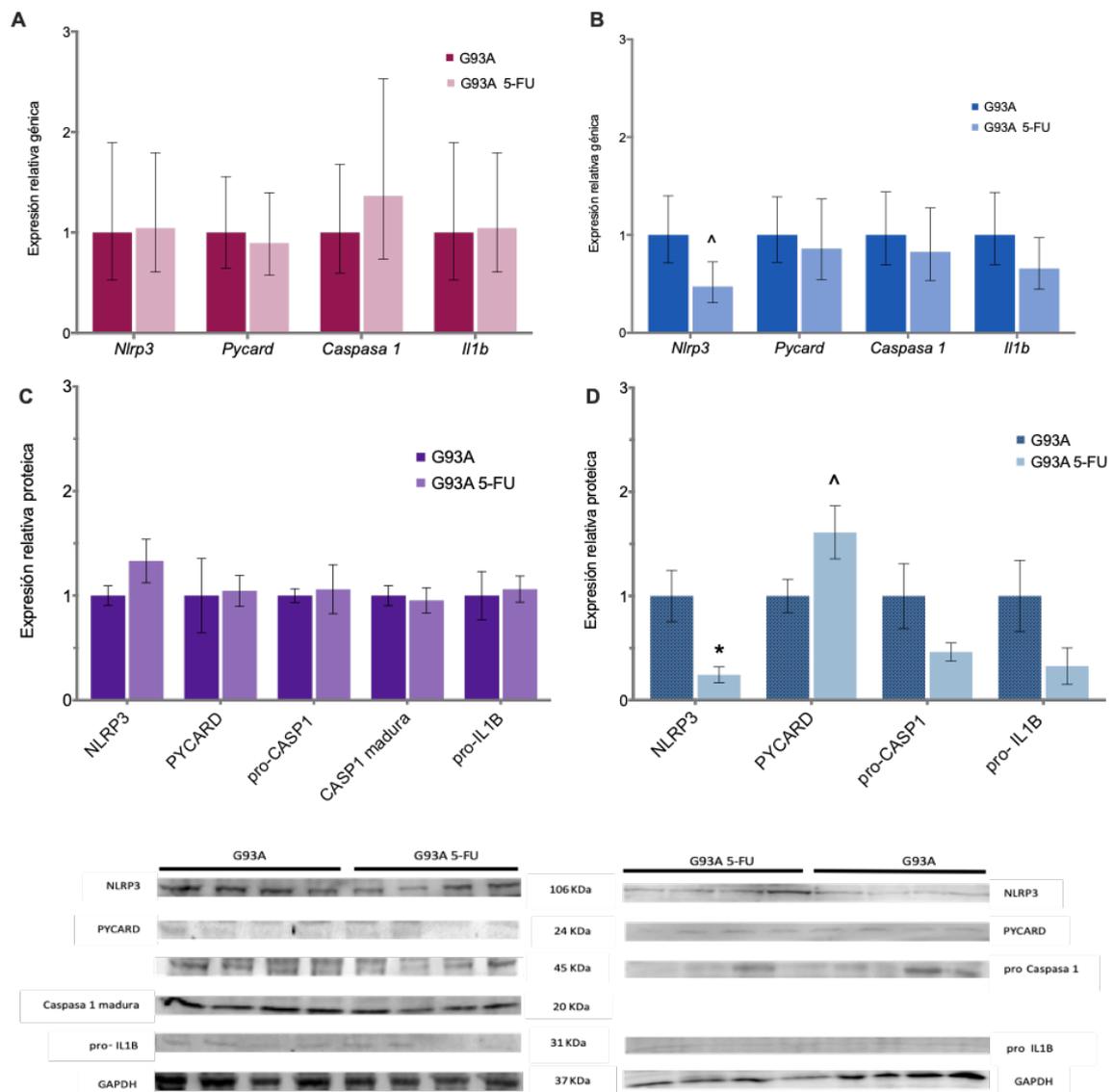


Figura 5.4. Estudio del inflammasoma NLRP3 en médula espinal en animales SOD1G93A tratados con 5-FU (150 mg/kg) y sus controles a lo largo de la patología. Perfil de expresión génica en (A) estadio presintomático tardío P85 y (B) estadio sintomático tardío P115. Los datos se muestran como expresión relativa media \pm error. Perfil de expresión proteica en estadio (C) presintomático tardío P85 y (D) sintomático tardío P115. Las bandas obtenidas se muestran debajo de los paneles correspondientes. Los datos se muestran como expresión relativa media \pm SEM. En todos los casos los datos están referidos al grupo control G93A (tomado como 1). t student, $^{\wedge}p<0,1$, $*p<0,05$, $**p<0,01$. n= 4-5 ratones/grupo.

En vista de los resultados anteriores, parece que el 5-FU afectaría de forma similar a los dos tejidos, ya que los perfiles de expresión, tanto génicos como proteicos, del inflamasoma NLRP3 variaron de forma análoga en el músculo esquelético y médula espinal.

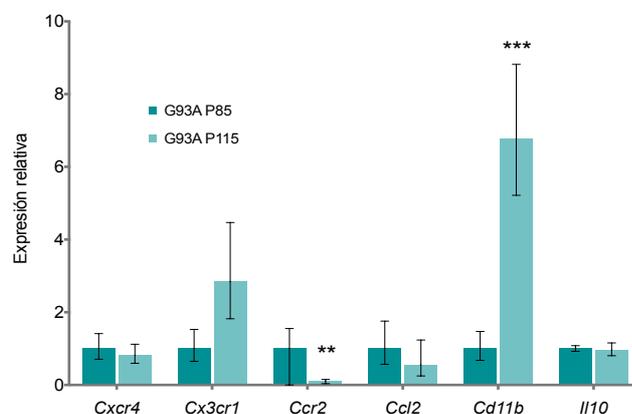
Por otro lado, además de la importancia que parece tener el inflamasoma NLRP3 en la patología también nos interesaron otros marcadores inflamatorios que se han descrito como alterados en la enfermedad ya que numerosos estudios han demostrado la participación crucial del proceso inflamatorio en el inicio y desarrollo de la ELA.

1.3. Expresión génica de otros marcadores de inflamación en médula espinal en animales SOD1G93A.

Trabajos previos de nuestro laboratorio han descrito modificaciones en la expresión de varios genes relacionados con la inflamación en el ratón SOD1G93A (Gasco et al., 2017). Por tanto, nos interesó conocer estos factores durante el progreso de la enfermedad y como eran modulados tras la aplicación del antineoplásico 5-FU.

Como era esperado y como se puede observar en la Figura 5.5, los animales transgénicos mostraron distintos perfiles de expresión para los genes estudiados; la expresión génica de *Cd11b/Itgam* se incrementó en el último estadio respecto al estadio presintomático ($p < 0,001$) a diferencia del gen *Ccr2* que disminuyó ($p = 0,004$). El resto de genes estudiados tuvieron una expresión similar entre los dos estadios, aunque *Cx3cr1* mostró tendencia a una mayor expresión en la etapa sintomática tardía. Los datos sugieren que, en la etapa sintomática tardía en los animales transgénicos no tratados, a pesar de existir un componente antiinflamatorio (caracterizado por niveles elevados de *Cx3cr1* y niveles bajos de *Ccr2*), se produce un fuerte carácter proinflamatorio reflejado en la alta expresión de *Cd11b*.

Figura 5.5. Expresión génica en médula espinal de machos SOD1G93A a diferentes tiempos de la patología (P85 y P115). Los valores están referidos a P85 (tomado como 1) y se muestran como expresión relativa media \pm error; t-Student, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. n= 4-5 animales/ grupo.



Por otro lado, analizando el efecto del 5-FU sobre la expresión génica en los diferentes estadios, se observó como tras una administración (estadio presintomático tardío) el 5-FU disminuyó muy significativamente los niveles de *Ccr2* respecto al transgénico no tratado ($p=0,001$), lo que podría indicar un efecto antiinflamatorio del tratamiento, aunque dicha disminución no se acompañó de un incremento de *Cx3cr1* (Figura 5.6). Sin embargo, tras tres administraciones (estadio P115), no se produjeron cambios en la expresión en los genes estudiados, aunque se llegó a observar una tendencia a menor expresión en *Cx3cr1* ($p=0,081$).

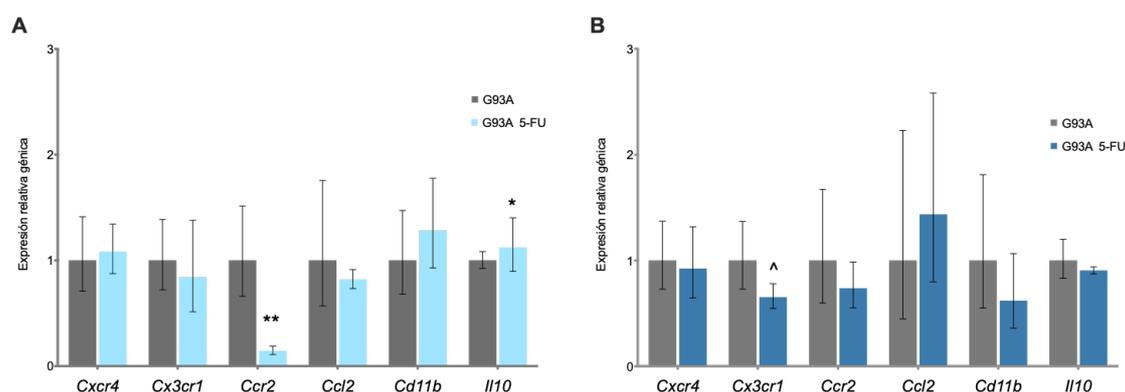


Figura 5.6. Expresión génica en médula espinal de animales SOD1G93A tratados con 5-FU y sus controles. Perfiles génicos en estadio (A) presintomático tardío P85 y (B) sintomático tardío P115. En ambos casos los valores están referidos al control G93A (tomado como 1) y se muestran como expresión relativa media \pm error; t-Student, ^ $p < 0,1$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. $n = 4-5$ animales/ grupo.

La Esclerosis Lateral Amiotrófica se caracteriza por una gran heterogeneidad en la que parece que están implicados diversos procesos patológicos que interactúan entre sí. Se han estudiado multitud de mecanismos que pueden participar en la patogenia como estrés oxidativo y del retículo endoplásmico (RE), excitotoxicidad inducida por glutamato, transporte axonal anormal, daño mitocondrial, neuroinflamación, apoptosis y plegamiento incorrecto de proteínas (Hardiman et al., 2017). En particular, la implicación de la neuroinflamación indica que las células gliales pueden participar en el daño selectivo y muerte de las motoneuronas (Lee et al., 2016). Esta neuroinflamación se caracteriza por microglía activada, astrogliosis e infiltrado de linfocitos y macrófagos periféricos que pueden inducir la muerte de las motoneuronas a través de citoquinas proinflamatorias y moléculas neurotóxicas (Beers & Appel, 2019; Philips & Robberecht, 2011). Al Sistema Nervioso Central se le ha considerado un tejido inmunológicamente privilegiado, sin embargo, evidencias muestran alteraciones tanto inmunes como inflamatorias en la ELA desde etapas tempranas de la enfermedad (Hooten et al., 2015; Jara et al., 2017). Por otro lado, clásicamente, se ha considerado que los efectos primarios de la

ELA sucedían en cerebro y médula espinal pero actualmente es aceptado que la alteración del músculo no es un evento secundario de la ELA (Lepore et al., 2019).

En los últimos años ha cobrado relevancia el papel de la neuroinflamación mediada por inflamomas. Se trata de complejos multiproteicos que forman parte integral de la respuesta inmune innata y actúan como sensores funcionales de estrés ambiental o celular. Son responsables de detectar y eliminar los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), así como patrones moleculares asociados al peligro (DAMPs) mediante la secreción de citoquinas proinflamatorias (Voet et al., 2019). Se ha demostrado el papel importante del inflamoma NLRP3 en varias enfermedades neurodegenerativas (Gordon et al., 2018; Heneka et al., 2013). Sin embargo, el papel del inflamoma NLRP3 en la ELA sigue no estando claro del todo. Por todo ello, nos propusimos estudiar aspectos de la neuroinflamación en dos de los tejidos más afectados por la enfermedad y como la administración del 5-FU modificaba dicha expresión.

Asumiendo que se produce una activación del inflamoma en los animales SOD1G93A, hecho respaldado por varios estudios (Bellezza et al., 2018b; Johann et al., 2015), nuestros resultados muestran como en cuádriceps, tras una administración de 5-FU, no se produjeron modificaciones a nivel génico ni proteico, por lo que el 5-FU parece que no produciría ningún cambio en el inflamoma NLRP3 en la etapa presintomática tardía (Figura 5.2A,C). Sin embargo, tras administrar el tratamiento hasta la etapa sintomática, los resultados sugieren que el 5-FU produciría una disminución de la expresión del complejo, sobre todo de la proteína NLRP3 y de IL1B (Figura 5.2D). Se ha demostrado que la activación de IL1B, después de ser activada por el inflamoma NLRP3, juega un papel crucial en la aparición y progresión de varias miopatías como miositis (Lundberg et al., 2000), sarcopenia (McBride et al., 2017) y Distrofia muscular de Duchenne (Boursereau et al., 2018; L. Chang et al., 2019). Numerosos estudios han mostrado como la inhibición específica de NLRP3 resulta en una inhibición del inflamoma y la consiguiente no producción de citoquinas inflamatorias.

Además, un estudio realizado con 5-FU en ratones SOD1G93A mostró que, al menos a nivel de transcripción, el 5-FU no tiene un efecto importante sobre los marcadores miogénicos, apoptóticos o autofágicos comúnmente elevados en músculo (Rando et al., 2018). Por tanto, el hecho de que tras la administración del 5-fu esté disminuida la expresión de NLRP3 y de IL1B, sugiere que podría resultar beneficioso ya que no se estaría promoviendo la respuesta inflamatoria, o se estaría produciendo a niveles muy bajos, de modo que al no liberarse grandes

cantidades de IL1B, no estaría exacerbando la inflamación y, por tanto, tal vez no estaría contribuyendo a la degeneración.

El papel del inflamasoma NLRP3 en músculo esquelético apenas se ha estudiado. Un estudio en cuádriceps de animales SOD1G93A correlacionó positivamente niveles altos de RNAm de NLRP3 en estadio temprano (75-105 días) y con la longevidad de los animales (Moreno García, 2017).

Por otra parte, la activación del inflamasoma en médula espinal se ha constatado en varios trabajos. Un estudio ha demostrado la capacidad de las proteínas SOD1 y TDP-43 de inducir la activación del inflamasoma en la microglía primaria de ratón a través de la señalización NLRP3 (Deora et al., 2020). En médula espinal, nuestros resultados sugieren que el 5-FU no modificaría el inflamasoma en estadio presintomático tardío (Figura 4C). Sin embargo, y al igual que en músculo, tras aplicar todo el tratamiento, el 5-FU produciría una disminución de NLRP3 (Figura 4D). Este hecho en principio podría resultar positivo, ya que la disminución en la activación del inflamasoma no amplificaría vías de señalización que impulsen respuestas proinflamatorias.

El inflamasoma NLRP3 necesita dos señales para que la activación se produzca completamente, en la primera señal actúan DAMPs y PAMPs mediante la activación de TLR y la vía NF-KB, esta señal sería indispensable para el primer paso de cebado del inflamasoma, en el que se produce la transcripción de NLRP3 y modificaciones postraduccionales de los componentes del inflamasoma. La segunda señal sería necesaria para el ensamblaje y la activación del complejo inflamasoma y podrían actuar una gran variedad de señales como ROS, agregados proteicos, disminución celular de K^+ y la ruptura del lisosoma entre otros (Zhou et al., 2016).

Con respecto a ciertas discrepancias que observamos entre los niveles de RNAm expresado y proteína en la etapa sintomática tardía, varios estudios han demostrado que los niveles de RNAm no son necesariamente predictivos de los niveles de proteínas debido a una relación muy compleja entre transcripción y traducción (Maier et al., 2009). Esta falta de correlación entre el RNAm y los niveles de proteína puede deberse a varias causas potenciales. En primer lugar, hay muchos mecanismos post-transcripcionales complejos involucrados en el paso entre el RNAm y la proteína que no son bien conocidos. Además, las proteínas pueden tener vidas medias muy diferentes, por lo que cuando se miden, la concentración obtenida no refleja la original y también pueden sufrir diferentes modificaciones post-traduccionales que

podrían afectar sus niveles esperados (Greenbaum et al., 2003; Vogel & Marcotte, 2012) Apoyando a esta discrepancia, un estudio sobre factores miogénicos en músculos de animales SOD1G93A y músculos denervados quirúrgicamente de ratones WT demostró que los transcritos pueden estar altamente afectados sin que se produzcan cambios a nivel proteico (Manzano et al., 2011). Asimismo, estudios previos realizados de inflammasoma NLRP3 en ELA han mostrado también desajustes entre los niveles transcripcionales y traduccionales (Johann et al., 2015; Lehmann et al., 2018).

La proteína SOD1 tiende con frecuencia a formar agregados y estos pueden ser una de las causas de la señalización de activación del inflammasoma, en concreto de la fase de ensamblaje. Teniendo en cuenta la capacidad descrita del 5-FU por bloquear y eliminar los agregados proteicos SOD1 (Pokrishevsky et al., 2018), una hipótesis es que el 5-FU pudiera disminuir estos agregados de proteína aberrante y como consecuencia no se produzca la activación (o se active menos) del inflammasoma. Son necesarios más estudios para confirmar esta hipótesis, así como para determinar la localización celular de los inflammasomas y el efecto del 5-FU sobre los mismos.

Tras una administración del 5-FU, los datos sugieren que no se está produciendo un reclutamiento de monocitos antiinflamatorios (niveles bajos *Cx3cr1*) ni monocitos proinflamatorios (niveles bajos *Ccr2*), sin embargo, sí se produce un aumento de *Il10*, de carácter antiinflamatorio. Por el contrario, en el estadio P115 en los animales tratados parece que hay un intento de reclutamiento de monocitos proinflamatorios (los niveles se incrementaron, aunque son menores que en los animales no tratados). Niveles aumentados de *Cd11b* sugiere que macrófagos y microglía de médula espinal intervienen en la degeneración o al menos que están activados, sin embargo, los niveles en los animales tratados disminuyen a P115. Teniendo en cuenta o asumiendo que el inflammasoma NLRP3 se expresa principalmente en microglía, esta disminución sería coherente con la disminución que observamos en el inflammasoma NLRP3. Estos datos reflejan el carácter dinámico de la inflamación, en el que no existe un único fenotipo concreto en el tiempo, sino que se produce un continuo entre los diferentes fenotipos.

CAPÍTULO 2

Expresión de miRNAs en animales SOD1G93A
a lo largo de la enfermedad

2. Expresión de microRNAs (miRNAs) en animales SOD1G93A a lo largo de la enfermedad.

Como se ha mencionado en la introducción, los microRNAs (miRNAs) son RNA no codificante conservados evolutivamente que pueden regular individualmente cientos de dianas a través de mecanismos de silenciamiento post-transcripcional dependientes de RNA. Cada vez hay más evidencias que sugieren que la desregulación de la biogénesis de los miRNAs y los cambios en su expresión podrían contribuir al daño de la motoneurona y a la progresión de la ELA (Rinchetti et al., 2018). Asimismo, está constatada la influencia en la ELA de la neuroinflamación, estudios recientes han destacado el papel emergente de miRNAs específicos en este proceso (Gaudet et al., 2017).

El modelo SOD1G93A se caracteriza por presentar ciertas diferencias en función del sexo. Los machos desarrollan una sintomatología más temprana, además de mostrar una progresión más rápida y menor esperanza de vida. Para la realización de este estudio, se emplearon grupos de machos SOD1G93A y se comenzó el día 70 de vida de los animales, momento de inicio del tratamiento. Los grupos difieren en el número de administraciones y, por tanto, en la duración del tratamiento (ver 4.3 de material y métodos), de modo que los grupos representan estadios diferenciados de la enfermedad: estadio presintomático tardío (P85), estadio sintomático (P100) y estadio sintomático tardío (P115).

Se estudiaron miRNAs implicados en la regulación de la inmunidad, la inflamación y en el desarrollo neuronal. En cuádriceps, también se estudió un miRNA específico de músculo esquelético, miR-206-3p, anteriormente demostrado su incremento en el modelo SOD1G93A y en pacientes de ELA (Toivonen et al., 2014). El objetivo de este trabajo fue valorar si la neurodegeneración en los animales iba acompañada de cambios en la expresión de estos miRNAs y, si el 5-FU modificaba el nivel de los mismos. El estudio se centró en los dos tejidos más afectados por la enfermedad, músculo esquelético (cuádriceps) y médula espinal. Clásicamente se ha considerado que los eventos primarios de la patología afectaban a cerebro y médula espinal, sin embargo, está constatada la contribución activa del músculo a la patología de la ELA (Dobrowolny et al., 2008; Raquel Manzano et al., 2020; Wong & Martin, 2010) y la implicación de miRNAs en la patología en ambos tejidos.

2.1. Expresión de miRNAs en el modelo SOD1G93A

2.1.1. Cuádriceps

Como se observa en la Figura 5.7, los miRNAs estudiados mostraron distintos perfiles de expresión en músculo. miR-21-5p y miR-206-3p aumentaron progresivamente su expresión durante el proceso neurodegenerativo. Sin embargo, los MicroRNAs miR-146a-5p, miR-9-5p, miR-155-5p y miR-223-3p, disminuyeron su nivel de expresión en el ultimo estadio (P115), después de experimentar un aumento en el estadio sintomático (P100). Dentro de este grupo, miR-9-5p disminuyó mucho la expresión existiendo diferencias significativas con la etapa inicial ($p=0,047$) y muy significativas con el estadio P100 ($p=0,002$). Cabe resaltar miR-223-3p que, tras el aumento experimentado en P100, mostró diferencias significativas con la etapa inicial ($p=0,016$) y muy significativas con el tercer estadio ($p=0,002$). Por el contrario, los MicroRNAs miR-21-5p, miR-124-3p y miR-206-3p mostraron mayor expresión en la etapa sintomática tardía, resultando diferencias muy significativas entre los estadios inicial y final en miR-21-5p ($p=0,004$) y miR-206-3p ($p=0,006$); en miR-124-3p se observó una tendencia no significativa, debido probablemente a la gran variabilidad intragrupo.

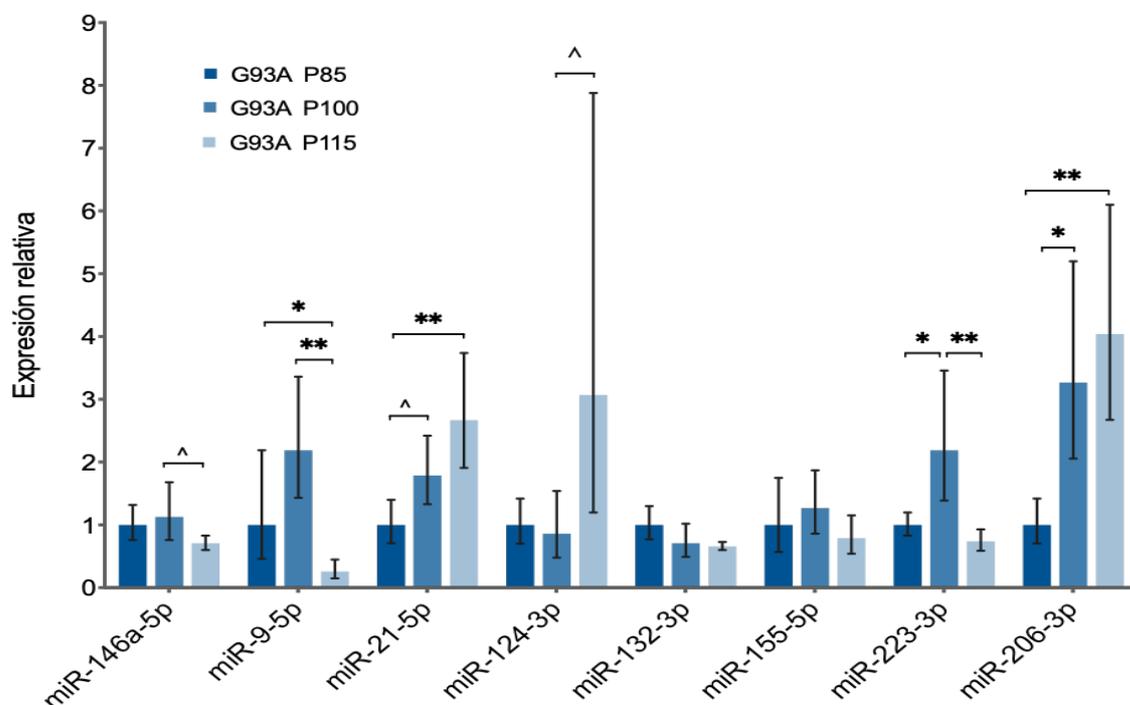


Figura 5.7. **Expresión relativa de miRNAs en cuádriceps de animales SOD1G93A a diferentes tiempos de la patología.** Los valores de expresión son relativos a P85 (tomado como 1) obtenidos por el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ y las barras de error son las obtenidas después de la conversión de $2^{-\Delta\Delta CT}$ de la desviación estándar. ANOVA, test Bonferroni o Games-Howell; ^ $p < 0,10$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; $n = 4-6$ animales/ grupo.

Tabla.5.1 Resumen de la expresión relativa de MicroRNAs en cuádriceps de animales SOD1G93A a diferentes tiempos de la patología. (^ p<0,10, *p< 0,05, **p< 0,01).

| | P85 | p (85-100) | P100 | p (100-115) | P115 | p (85-115) |
|------------|-----|------------|------|-------------|------|------------|
| miR-146-5p | - | | ↑ | ^ | ↓ | |
| miR-9-5p | - | | ↑ | ** | ↓ | * |
| miR-21-5p | - | ^ | ↑ | | ↑ | ** |
| miR-124-3p | - | | ↓ | ^ | ↑ | |
| miR-132-3p | - | | ↓ | | = | |
| miR-155-5p | - | | ↑ | | ↓ | |
| miR-223-3p | - | * | ↑ | ** | ↓ | |
| miR-206-3p | - | * | ↑ | | ↑ | ** |

2.1.2. Médula espinal

En médula espinal, en general, los miRNAs estudiados mostraron niveles más altos de expresión comparando con el músculo (Figura 5.8). Al contrario que en músculo, el perfil de expresión fue similar en la mayoría de todos ellos, mostrando mayores niveles de expresión en la etapa final P115. Los miRNAs miR-21-5p, miR-124-3p y miR-223-3p, aunque parecían disminuir en P100, incrementaron en la etapa final su expresión mostrando diferencias todos ellos con el estadio P100 (p= 0,001, p=0,023, p=0,032). El resto de miRNAs aumentaron su expresión con el progreso de la neurodegeneración. Asimismo, entre las etapas inicial y final, se observaron diferencias significativas en los MicroRNAs miR-146a-5p, (p=0,018), miR-9-5p (p=0,021) y muy significativas en miR-21-5p (p=0,007), miR-132-3p (p=0,007), y miR-155-5p (p=0,004). Sin embargo, en miR-223-3p y miR-124-3p, no se observaron estas diferencias. miR-155-5p fue el más incrementado, mostrando más de 6 veces la expresión de la etapa P100 (p< 0,001) y de P85 (p=0,004).

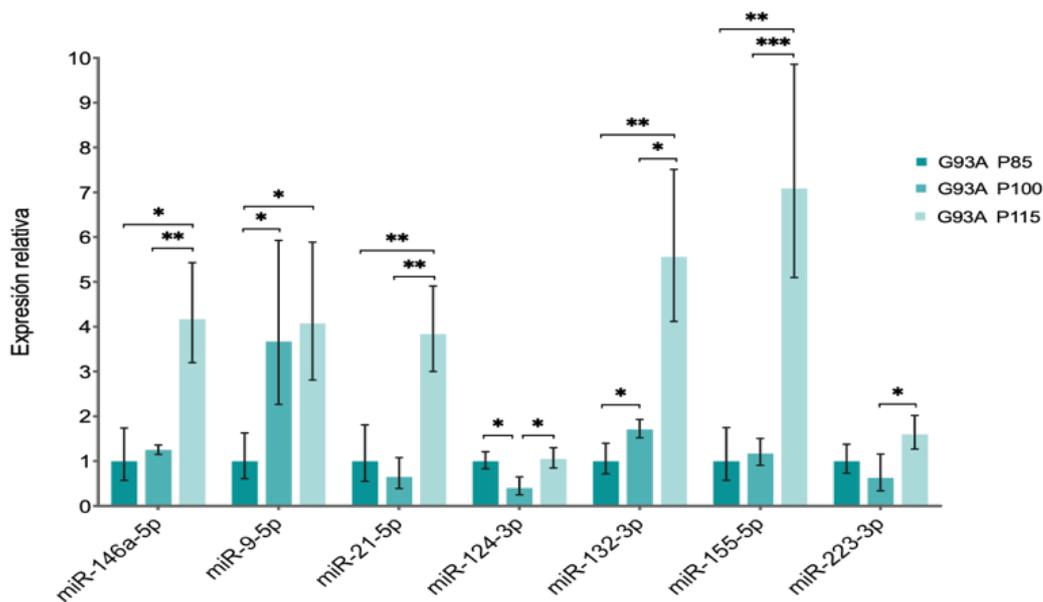


Figura 5.8. **Expresión relativa de miRNAs en médula espinal de animales SOD1G93A a diferentes tiempos de la patología.** Los valores de expresión son relativos a P85 (tomado como 1) y obtenidos por el método $2^{-\Delta\Delta CT}$, las barras de error son las obtenidas después de la conversión de $2^{-\Delta\Delta CT}$ de la desviación estándar. ANOVA, test Bonferroni o Games-Howell; *p< 0,05, **p< 0,01, *** p< 0,001. n= 4-6 animales/grupo.

Tabla 5.2. Resumen de la expresión relativa de MicroRNAs en médula espinal de animales SOD1G93A a diferentes tiempos de la patología. (^ p<0,10, *p< 0,05, **p< 0,01, ***p <0,001).

| | P85 | p (85-100) | P100 | p (100-115) | P115 | p(85-P115) |
|-------------------|-----|------------|------|-------------|------|------------|
| miR-146-5p | - | | ↑ | ** | ↑↑ | * |
| miR-9-5p | - | * | ↑↑ | | ↑ | * |
| miR-21-5p | - | ^ | ↓ | *** | ↑↑ | ** |
| miR-124-3p | - | * | ↓ | | ↑ | * |
| miR-132-3p | - | * | ↑ | * | ↑↑ | ** |
| miR-155-5p | - | | ↑ | *** | ↑↑↑ | ** |
| miR-223-3p | - | | ↓ | * | ↑ | |

Los resultados anteriores parecen sugerir que en el curso de la enfermedad en el modelo SOD1G93A se produce una distinta expresión y regulación de los miRNA en función del tejido. En médula espinal, se encontraron muy sobreexpresados en la etapa final; sin embargo, en cuádriceps la mayoría mostraron menor expresión

2.2.- Expresión de miRNAs en animales SOD1G93A tratados con 5-FU

Después de analizar la evolución de la expresión de miRNAs en los animales SOD1G93A, nos interesó conocer la evolución de dicha expresión en los mismos animales tratados con 5-FU.

2.2.1. Cuádriceps

En el músculo esquelético de animales tratados con 5-FU (Figura 5.9), al igual que en los animales transgénicos control, se observaron diferentes perfiles de expresión. Los MicroRNAs miR-146a-5p y miR-132-3p mostraron menores niveles con el progreso de la enfermedad, existiendo diferencias significativas en miR-132-3p ($p=0,021$). Por el contrario, otros expresaron un progresivo aumento como miR-21-5p y miR-124-3p. Asimismo, miR-155-5p y miR-223-3p volvieron a mostrar un aumento en P100 seguido de una disminución en P115, existiendo una tendencia entre los dos últimos estadios en los dos miRNA ($p=0,067$) y ($p=0,084$). Cabe resaltar miR-206-3p, cuyo patrón fue diferente al de los animales control ya que las diferencias progresivas significativas observadas en los animales sin tratar (Figura 5.7) en este caso no se observaron tras la administración de 5-FU. miR-9-5p en P100 fue el que mostró mayor incremento, triplicando la expresión de la etapa sintomática temprana y mostrando diferencias significativas con el estadio presintomático tardío ($p=0,048$) y muy significativas con el estadio P1115 ($p=0,000$)

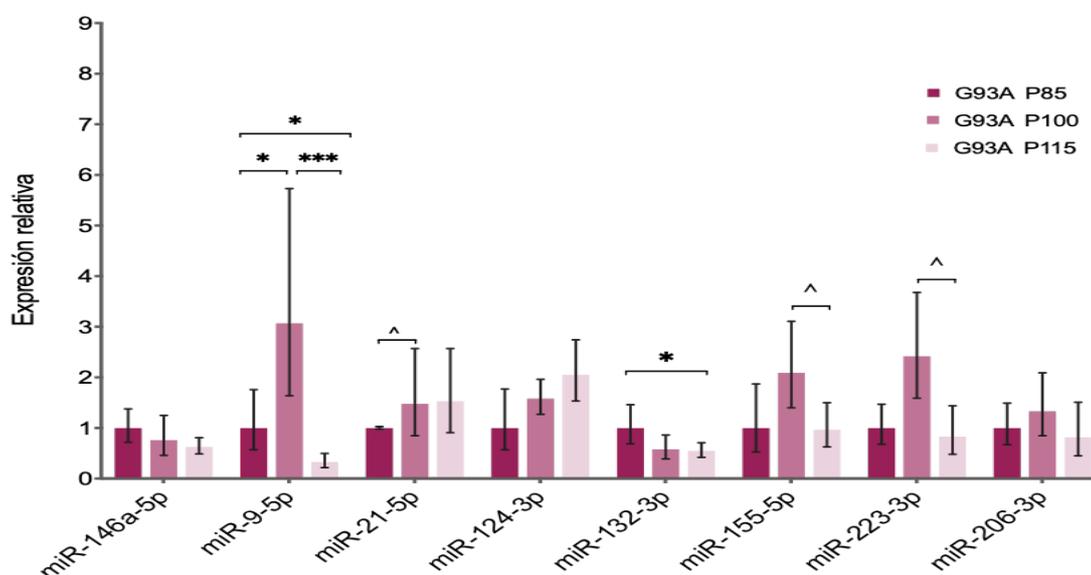


Figura 5.9. **Expresión relativa de miRNAs en cuádriceps de animales SOD1G93A tratados con 5-FU (150 mg/kg) a diferentes tiempos de la patología.** Los valores de expresión son relativos a P85 (tomado como 1), obtenidos por el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ y las barras de error son las obtenidas después de la conversión de $2^{-\Delta\Delta CT}$ de la desviación estándar. ANOVA, test Bonferroni o Games-Howel, $\wedge p < 0,10$, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. $n = 4-6$ animales/grupo.

Tabla. 5.3. Resumen de la expresión relativa de MicroRNAs en cuádriceps de animales SOD1G93A tratados con 5-FU (150 mg/kg) a diferentes tiempos de la patología (^ p< 0,10, *p< 0,05, ***p < 0,001).

| | P85 | p (85-100) | P100 | p (100-115) | P115 | p (85-115) |
|------------|-----|------------|------|-------------|------|------------|
| miR-146-5p | - | | ↓ | | ↓ | |
| miR-9-5p | - | * | ↑↑ | *** | ↓↓ | * |
| miR-21-5p | - | | ↑ | | = | |
| miR-124-3p | - | | ↑ | | ↑ | |
| miR-132-3p | - | | ↓ | | = | * |
| miR-155-5p | - | | ↑ | ^ | ↓ | |
| miR-223-3p | - | | ↑ | ^ | ↓ | |
| miR-206-3p | - | | ↑ | | ↓ | |

2.2.2 Médula espinal

En médula espinal, los perfiles de expresión (Figura 5.10), fueron similares a los de los grupos control. Todos los miRNAs mostraron un aumento de la expresión conforme avanzó el proceso neurodegenerativo, excepto miR-21-5p, miR-124-3p y miR-223-3p, que disminuyeron su expresión en P100 con un posterior aumento en P115. Asimismo, todos excepto miR-223-3p, tuvieron diferencias significativas o muy significativas entre la primera y última etapa. Por el contrario, los más aumentados fueron miR-146-5p y miR-132-3p, mostrando más de 4 veces los niveles de expresión inicial.

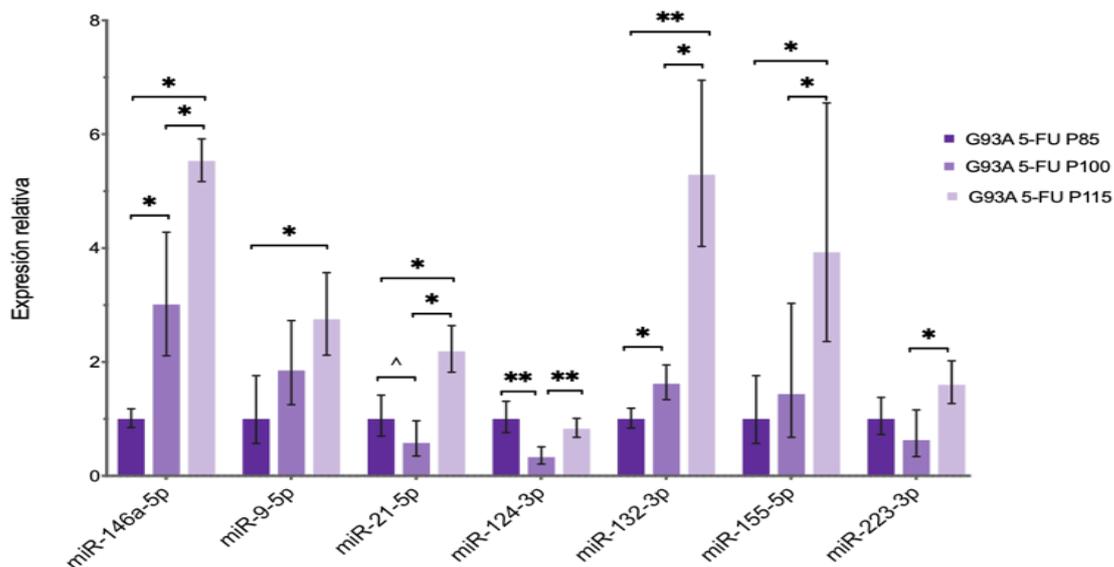


Figura 5.10 Expresión relativa de miRNAs en médula espinal de animales SOD1G93A tratados con 5-FU (150 mg/kg) a diferentes tiempos de la patología. Los valores de expresión son relativos a P85 (tomado como 1), obtenidos por el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ y las barras de error son las obtenidas después de la conversión de $2^{-\Delta\Delta CT}$ de la desviación estándar. ANOVA, test Bonferroni o Games-Howell; *p< 0,05, **p< 0,01. n= 4-6 animales/grupo.

Tabla.5.4 Resumen de la expresión relativa de MicroRNAs en médula espinal de animales SOD1G93A tratados con 5-FU (150 mg/kg) a diferentes tiempos de la patología (^ p<0,10, *p< 0,05, **p< 0,01).

| | P85 | p (85-100) | P100 | p (100-115) | P115 | p (85-115) |
|------------|-----|------------|------|-------------|------|------------|
| miR-146-5p | - | * | ↑ | * | ↑↑ | * |
| miR-9-5p | - | | ↑ | | ↑ | * |
| miR-21-5p | - | ^ | ↓ | * | ↑ | * |
| miR-124-3p | - | ** | ↓ | ** | ↑ | |
| miR-132-3p | - | * | ↑ | * | ↑↑ | ** |
| miR-155-5p | - | | ↑ | * | ↑ | * |
| miR-223-3p | - | | ↓ | * | ↑ | |

Después de estudiar la evolución de la expresión en los animales control y tratados por separado, nos interesó estudiar el efecto del 5-FU respecto a los animales control en los diferentes estadios.

2.3. Modificación de miRNAs en animales SOD1G93A tras la administración de 5-FU.

2.3.1. Cuádriceps

Como puede observarse en la Figura 5.11, la aplicación del 5-FU en el modelo animal solo modificó la expresión de un miRNA en la etapa presintomática tardía P85 (Figura 5.11A), aumentando significativamente la expresión de miR-21-5p (p=0,031); sin embargo, en las otras dos etapas sintomáticas no se produjo ninguna variación significativa (Figuras 5.11B y 5.11C).

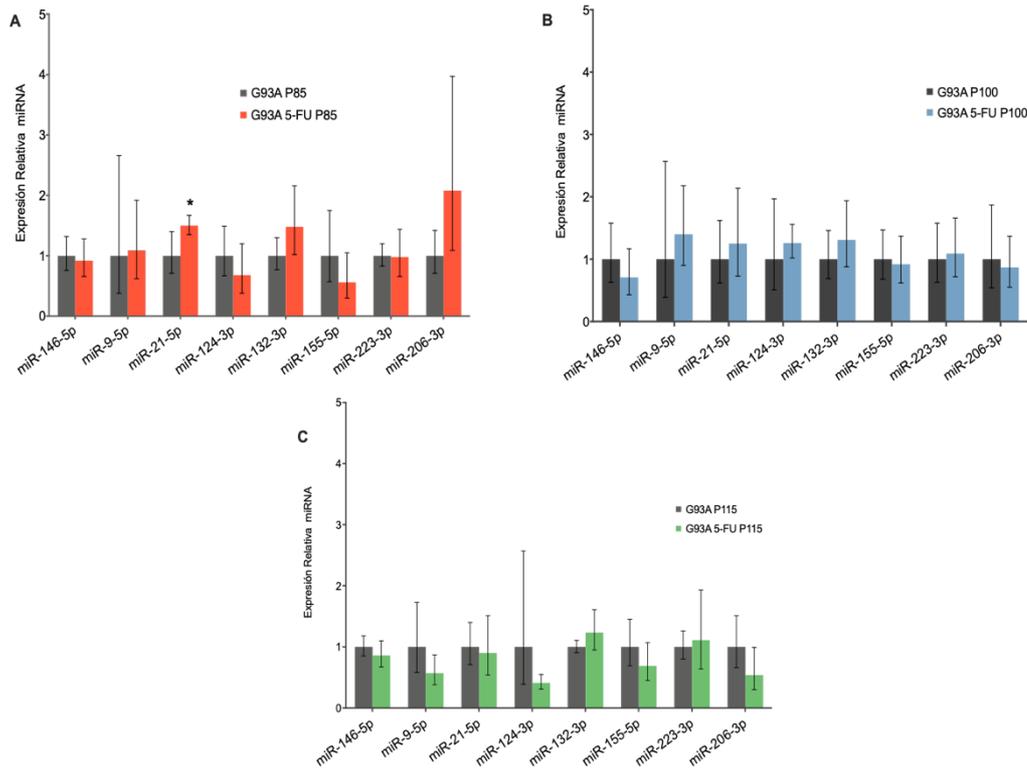


Figura 5.11 **Expresión relativa de miRNA en cuádriceps de animales SOD1G93A tratados con 5-FU (150 mg/kg) y sus controles a distintos tiempos de la patología.** Se muestra estadio (A) presintomático tardío P85, (B) sintomático P100 (C) sintomático tardío P115. Los valores de expresión en cada uno de ellos son relativos a G93A control (tomado como 1), obtenidos por el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ y las barras de error son las obtenidas después de la conversión de $2^{-\Delta\Delta CT}$ de la desviación estándar. (t-student, * $p < 0,05$); $n = 4-6$ animales/grupo.

2.3.2. Médula espinal

Como puede observarse en la Figura 5.12, en la médula espinal la aplicación del 5-FU en los animales SOD1G93A solamente modificó 3 miRNAs en los distintos estadios. En P85 disminuyó miR-223-3p ($p=0,029$), en P100 incrementó miR-146-5p ($p=0,028$), y se observó una tendencia de aumento en miR-21-5p. En el estadio final no hubo ninguna modificación tras la aplicación del tratamiento.

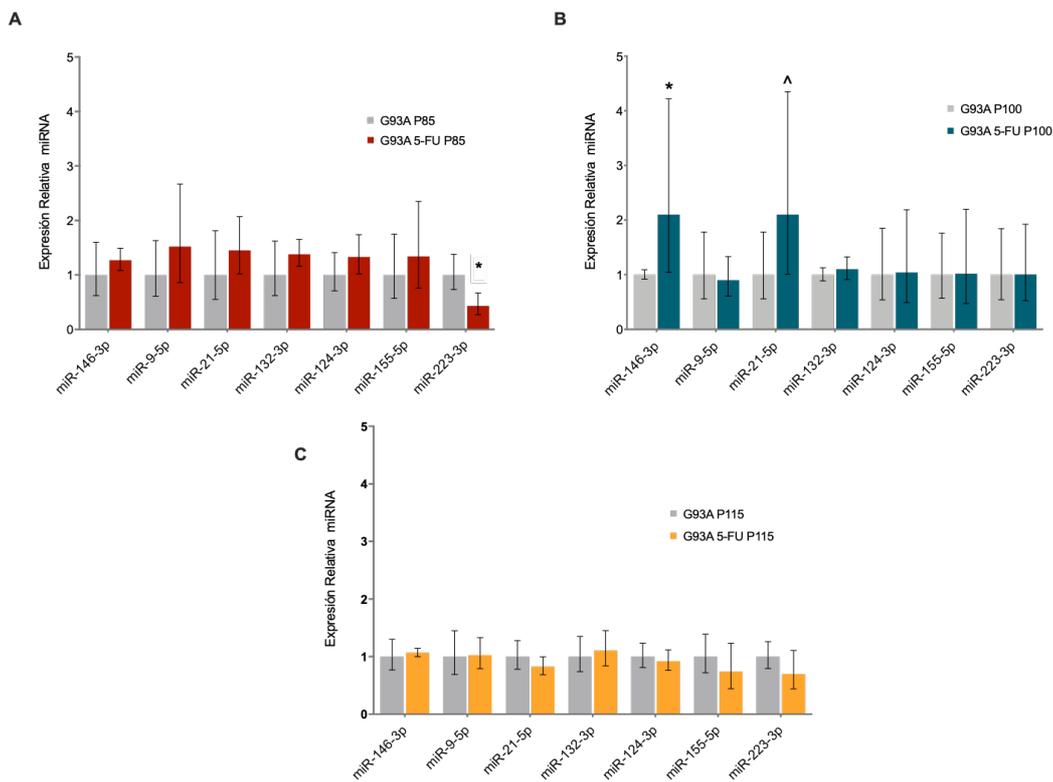


Figura 5.12. **Expresión relativa de miRNA en médula espinal de animales SOD1G93A tratados con 5-FU (150 mg/kg) y sus controles a distintos tiempos de la patología.** Se muestra estadio (A) presintomático tardío P85 (B) sintomático P100 (C) sintomático tardío P115. Los valores de expresión en cada uno de ellos son relativos a G93A control (tomado como 1), obtenidos por el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ y las barras de error son las obtenidas después de la conversión de $2^{-\Delta\Delta CT}$ de la desviación estándar. t-student, * $p < 0,05$; ^ $p < 0,1$. $n = 4-6$ animales/grupo.

Aunque la ELA no se considera principalmente una patología inflamatoria o inmunológica, los mecanismos inmunes e inflamatorios parecen tener un papel clave en la patogenia. Conocer el papel y la regulación que tienen es clave para comprender los mecanismos que pueden intervenir e incluso para la búsqueda de potenciales terapias. Curiosamente, los miRNAs estudiados en este trabajo son los que están desregulados con mayor frecuencia en muchas enfermedades neurodegenerativas (Juźwik et al., 2019). Además, estudios previos han descrito una expresión dinámica de estos en varias neurodegenerativas como ELA o trastornos priónicos. Nuestros resultados, tanto de músculo como de médula espinal, coinciden con este dinamismo, ya que se observan variaciones en las expresiones a lo largo del proceso degenerativo. La regulación de los miRNAs parece que varía en función del tejido, estando relativamente más afectados en el SNC, lo que podría sugerir que en el SNC el proceso inflamatorio es más acusado o que estos miRNAs están más implicados en el SNC.

Dentro de los miRNAs de carácter proinflamatorio, uno con un potente papel en varias patologías neurodegenerativas es miR-155-5p, regulador clave tanto del sistema inmune innato

como adaptativo e implicado específicamente en la polarización de células mieloides a un estado proinflamatorio (Butovsky et al., 2015). Además, miR-155-5p puede promover vías proinflamatorias a través de la represión dirigida de mediadores antiinflamatorios (Juźwik et al., 2019). En la ELA, miR-155-5p se ha encontrado elevado en médula espinal y monocitos periféricos tanto en ratón SOD1G93A como en pacientes con ELAE y ELAF, de hecho, la ablación genética o el uso de un anti-miR-155-5p disminuye el reclutamiento de monocitos, ralentiza la progresión y prolonga la vida de los animales (Butovsky et al., 2015; Koval et al., 2013). Nuestros resultados están en consonancia con estos datos, ya que observamos un gran incremento de miR-155-5p en médula espinal de transgénicos control conforme progresa la enfermedad (Figura 5.8). Sin embargo, este aumento se observa también en los animales tratados con 5-FU (Figura 5.10) y no hay diferencias significativas entre los grupos tratados y controles en ninguna etapa (Figura 5.12).

miR-146a-5p actúa como un regulador negativo de la inflamación, es inducido por la activación de NF- κ B y retroalimenta negativamente esta vía inhibiendo la traducción de IRAK1 y TRAF6 (Juźwik et al., 2019), disminuyendo de este modo la inflamación descontrolada producida por células mieloides. Además, su efecto sobre IRAK1 y TRAF6 reduce la adhesión de células T *in vitro*, lo que indica que puede afectar a la capacidad de las células inmunes para atravesar la barrera hematoencefálica (Wu et al., 2015). Curiosamente, NF-KB induce directamente la expresión de dos miRNAs con papeles divergentes como mir-155-5p y mir-146-5p. Cabe resaltar que observamos distinta expresión en cuádriceps y médula espinal; mientras en cuádriceps ambos miRNAs parecen disminuir con el progreso neurodegenerativo, en médula están incrementados, lo que sugiere que en cuádriceps podrían estar involucradas otras vías (incluso otros miRNAs) de modulación de la inflamación. Si observamos el efecto del 5-FU respecto a los transgénicos control, en cuádriceps no hay cambios significativos en los niveles de miR-146-5p. Sin embargo, en médula espinal se produce un incremento significativo tras dos administraciones de 5-FU, es decir, en periodo sintomático temprano (Figura 5.12B), sugiriendo un posible efecto contra la inflamación producida. Sin embargo, parece que el 5-FU no es suficiente para restaurar la homeostasis, reflejado por los niveles similares entre transgénicos y tratados encontrados en la etapa sintomática tardía.

MicroRNA miR-9-5p está implicado en la neurogénesis y previamente se ha encontrado aumentado en médula espinal de ratón SOD1G93A. (Koval et al., 2013; Zhou et al., 2013). Nuestros datos coinciden con este hallazgo ya que en médula de animales transgénicos miR-9-5p aumentó con la degeneración, lo que sugiere una proliferación y diferenciación de progenitores

neuronales en un intento de contrarrestar la pérdida de motoneuronas. Sin embargo, no observamos un efecto del 5-FU a los niveles de miR-9-5p en ninguno de los dos tejidos.

Un modulador de la neuroinflamación con carácter antiinflamatorio como miR-21-5p es sobreexpresado en células inmunitarias activadas, incluidos neutrófilos, células dendríticas, monocitos / macrófagos y células T (Gaudet et al., 2017). La expresión de miR-21-5p se induce durante la activación de TLR4 y promueve la producción de IL-10 (Sheedy, 2015; Sheedy et al., 2010). En médula observamos una tendencia de aumento tras la administración de 5-FU en el estadio sintomático que curiosamente, se acompaña también de un aumento de miR-146-5p, lo que podría sugerir que el 5-FU podría interferir en el proceso inflamatorio (Figura 12.B).

miR-223-3p se considera un microRNA hematopoyético debido a su importante papel en la diferenciación de células mieloides como granulocitos y macrófagos además de la activación de células dendríticas (Juźwik et al., 2019). Ejerce su efecto sobre las células inmunitarias periféricas, impulsando un fenotipo antiinflamatorio en los macrófagos (Gaudet et al., 2017) a través de la modulación de la vía NF-KB, Además, se ha demostrado su regulación negativa sobre el inflamasoma NLRP3, afectando a los niveles de RNAm de NLRP3 (Bauernfeind et al., 2012)

En el músculo esquelético, se observó que se producían varias de las alteraciones de miRNAs mencionadas anteriormente durante el curso de la patología. Sin embargo, al comparar los efectos específicos cada etapa del 5-FU en animales transgénicos (Figura 5.11), solo se observaron dos alteraciones: miR-21-5p y miR-206-3p se aumentaron en la etapa presintomática tardía (P85). No hubo efectos significativos del 5-FU en las etapas posteriores.

El papel de miR-21-5p en el músculo esquelético no se conoce bien, aunque se ha sugerido que regula negativamente la miogénesis durante el envejecimiento (Borja-Gonzalez et al., 2020). Este estudio concluyó que el aumento de miR-21-5p en las células satélite y el músculo durante el envejecimiento puede ocurrir en respuesta a niveles elevados de citoquinas proinflamatorias (como TNF α e IL6), dentro de las células satélite o del entorno miofibrilar, lo que contribuye a la disminución del potencial de regeneración muscular. La administración de 5-FU aumentó el miR-21-5p en los cuádriceps, lo que sugiere que no es probable que este efecto sea antiinflamatorio, pero en realidad podría ser un signo de lo contrario, es decir, indicar un estado inflamatorio aumentado por la administración del fármaco.

Por otro lado, miR-206 pertenece al denominado grupo “myomiR” y se expresa específicamente en músculo esquelético; estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado su participación en la formación de miofibras, la diferenciación de células satélite y la formación de

nuevas uniones neuromusculares después de una lesión nerviosa (Chen et al., 2010). En ratones SOD1G93A, miR-206 se encuentra aumentado desde el inicio de los síntomas, su ablación genética induce una rápida progresión, retraso de la reinervación y regeneración de la unión neuromuscular y una mayor atrofia muscular (Williams et al., 2009). De hecho, se ha demostrado un aumento de miR-206 en músculos de contracción rápida, así como en plasma de animales SOD1G93A y de pacientes con ELA (Toivonen et al., 2014). Los estudios sugieren que miR-206 es importante para la regeneración de las sinapsis neuromusculares, posiblemente al regular negativamente la histona deacetilasa 4 (HDAC4) e inducir la vía de señalización del factor de crecimiento de fibroblastos (Williams et al., 2009); se considera que tal vez ejerza un efecto neuroprotector al favorecer la formación de nuevas sinapsis en un intento de retrasar la progresión de la enfermedad (De Paola et al., 2019).

En los animales transgénicos sin tratar, se observa un aumento de miR-206-3p conforme avanza la enfermedad (Figura 5.7), dato que concuerda con los estudios anteriormente citados y sugiriendo que, a estadio sintomático tardío, la denervación producida es importante por lo que la sobreexpresión de miR-206-3p sería un intento de retrasar la progresión de la denervación. Por otro lado, en animales tratados con 5-FU (Figura 5.9) observamos que los niveles de miR-206-3p no aumentan respecto al estadio presintomático tardío (P85). Por otro lado, al comparar los efectos específicos en cada etapa del 5-FU en animales transgénicos (Figura 5.11), se observa un aumento por el tratamiento en P85 seguido de una tendencia a disminuir en etapas posteriores de la enfermedad, a pesar de no observarse cambios significativos. Estos datos podrían sugerir que tal vez el 5-FU pudiera ralentizar el proceso degenerativo a nivel muscular, aumentando la expresión de miR-206-3p en estadios tempranos y, como consecuencia, produciéndose menor denervación (y menos expresión de miR-206-3p) en las etapas más tardías. Sin embargo, como no tenemos evidencia de si el 5-FU puede afectar directamente la expresión de miR-206-3p, también es posible que las diferencias observadas en la presencia y ausencia de 5-FU sean indirectas, por ejemplo, a través de modificaciones sutiles del estado de denervación o respuesta regenerativa miogénica.

En conclusión, observamos una modulación dinámica y compleja de los miRNAs en la que pueden intervenir procesos tanto inflamatorios como antiinflamatorios que interactúan entre sí. Basado en los resultados presentados, no podemos concluir que los miRNAs estudiados tengan un papel claro en el efecto del 5-FU en la neuroinflamación en los ratones SOD1G93A. Son necesarios más estudios para aclarar el papel del 5-FU en estos procesos.

CAPÍTULO 3

Biodisponibilidad de 5-Fluorouracilo y Capecitabina
en el modelo SOD1G93A

3. Biodisponibilidad de 5-Fluorouracilo y Capecitabina en el modelo SOD1G93A

Como se ha comentado en la introducción, existen análogos y profármacos del quimioterápico 5-Fluorouracilo que difieren de este último con respecto a algunas características. El profármaco Capecitabina se administra por vía oral y muestra un perfil de seguridad superior al del 5-FU, aunque su eficiencia terapéutica como tratamiento para el cáncer es parecida (Cassidy et al., 2002). Por ello, si se muestra efectiva y no tóxica en nuestro modelo, la administración de Capecitabina podría ser una estrategia alternativa para facilitar el tratamiento de los afectados de ELA.

En primer lugar, nos interesó conocer el perfil farmacocinético de 5-FU y Capecitabina en el suero de los animales en nuestras condiciones. Para ello, se administraron dosis equimolares de ambos fármacos y se tomaron muestras sanguíneas a distintos tiempos (Figura 5.13A). Como se ilustra en la figura 5.13B, el pico máximo de detección de los dos fármacos se produjo a los 15 minutos, aunque la concentración sérica máxima detectada de Capecitabina fue la mitad que la del 5-FU (55,04 y 102,41 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectivamente). Tras este tiempo, se produjo una rápida disminución de la concentración de 5-FU siendo indetectable a partir de los 60 minutos. En el caso de la Capecitabina, parece tener una vida media más prolongada ya que la disminución de la concentración fue más lenta pudiéndose detectar hasta los 240 minutos post-administración.

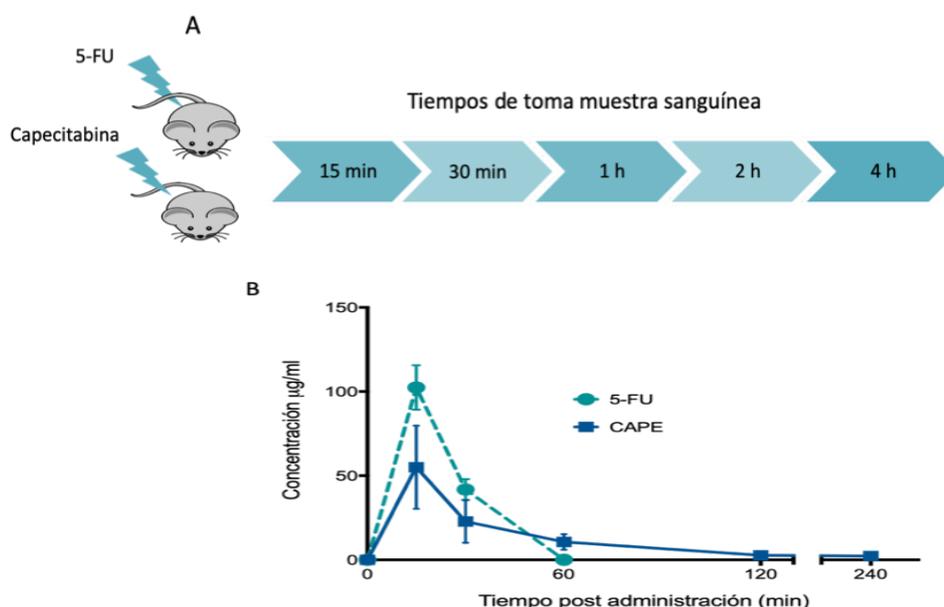


Figura 5.13. Estudio farmacocinético de 5-FU y Capecitabina en ratones *wild-type*. (A) Cronograma de la obtención de suero tras la administración de 5-FU y Capecitabina (B) Perfil farmacocinético de 5-FU y Capecitabina en suero. Los datos representan la media \pm SEM, $n=3$ para cada tiempo y fármaco.

Para conocer si la Capecitabina producía toxicidad en nuestro modelo animal y/o mostraba efectividad sobre la supervivencia de los animales, realizamos un ensayo preclínico piloto en ratones SOD1G93A de ambos sexos que comenzó a los 70 días de edad, momento de inicio del tratamiento, y siguió la misma pauta temporal de administración que ensayos previos de 5-FU, es decir, una administración quincenal realizando un total de tres administraciones. Durante la realización del ensayo y hasta su finalización, no se observaron signos de toxicidad potencialmente atribuibles al fármaco como heces blandas, anorexia, piloerección, reacciones cutáneas, dificultad respiratoria o comportamientos anómalos.

En el estudio de supervivencia, la primera muerte del grupo control se produjo el día 119 y la última el día 145. En el caso del grupo tratado, la primera y última muerte se produjeron los días 126 y 149 respectivamente. La administración oral de Capecitabina parecía prolongar la media de supervivencia de los ratones tratados frente a sus controles (Figura 3.2), aunque estas diferencias no resultaron significativas (137 ± 3 vs $132 \pm 2,9$ días; test Mantel-Cox Log-Rank $p=0,183$).

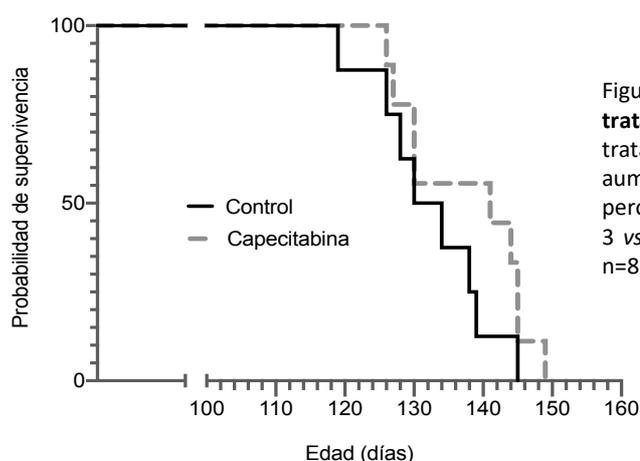


Figura 5.14. **Supervivencia de ratones SOD1G93A tratados con Capecitabina (414 mg/kg).** El grupo tratado (línea gris) mostró una vida media aumentada respecto al grupo control (línea negra) pero estas diferencias no fueron significativas (137 ± 3 vs $132 \pm 2,9$ días, Mantel-Cox Log-Rank $p=0,183$). $n=8$ animales control y 10 animales tratados.

Por otro lado, quisimos conocer la biodisponibilidad del fármaco 5-FU en hígado, suero y en nuestros tejidos de interés, músculo esquelético y médula espinal. De todas las muestras analizadas ($n=6$, 3 de cada genotipo) y, tras la aplicación de distintos métodos de detección (HPLC y HPLC asociada a espectroscopia de masas) en distintos laboratorios, el único tejido donde se detectó el fármaco fue en médula espinal, tanto en animales *wild type* como en transgénicos. La concentración detectada fue pequeña y no se pudo cuantificar con suficiente sensibilidad en todos los animales estudiados (Tabla 5.5). El bajo nivel detectado de 5-FU no permite concluir que la ruptura propuesta de barrera hematoencefálica en ratones SOD1G93A (Garbuzova-Davis et al., 2007; Winkler et al., 2014) pudiera modificar la biodisponibilidad de 5-

FU en el SNC, ya que también se ha detectado el fármaco en animales WT. Sin embargo, este resultado muestra que el 5-FU, aunque en muy poca cantidad, es capaz de atravesar dicha barrera hematoencefálica. La no detección del fármaco en hígado resultó algo esperado, ya que es rápidamente metabolizado en este órgano (Longley et al., 2003). En el caso del suero, el resultado también fue el esperado porque en este estudio la toma de muestras fue a las 2 horas post-administración y, como se puede observar en la gráfica 5.13B, el fármaco no se detecta a partir de los 60 minutos post administración. Sin embargo, la no detección en músculo fue un resultado inesperado, debido a la mayor accesibilidad a este tejido de los fármacos frente al SNC. No obstante, no podemos descartar que este resultado pueda deberse a limitaciones en la técnica o a las características del tejido.

Tabla 5.5. Detección de 5-Fluorouracilo en tejidos.

| Código | Tipo análisis | Resultado |
|------------------|----------------------|--------------------------|
| <i>Mus WT 3</i> | 5-FU | < LC |
| <i>Mus WT 4</i> | 5-FU | < LC |
| <i>Mus WT 5</i> | 5-FU | < LC |
| <i>Mus WT 7</i> | 5-FU | < LC |
| <i>Mus WT 8</i> | 5-FU | < LC |
| <i>Mus WT 9</i> | 5-FU | < LC |
| <i>Med WT 3</i> | 5-FU | < LC (entre 1.67-3 µg/L) |
| <i>Med WT 4</i> | 5-FU | < LC (entre 1.67-3 µg/L) |
| <i>Med WT 5</i> | 5-FU | < LC (entre 1.67-3 µg/L) |
| <i>Med SOD 7</i> | 5-FU | < LC (entre 1.67-3 µg/L) |
| <i>Med SOD 8</i> | 5-FU | < LC (entre 1.67-3 µg/L) |

Mus: músculo (cuádriceps), Med: médula espinal, WT: *wild type*, SOD: SOD1G93A. LC: 3,33 µg/L en muestra. LC: límite de cuantificación.

Tras los resultados obtenidos sobre la efectividad de la capecitabina y la biodistribución del 5-FU, decidimos intentar incrementar el efecto terapéutico del 5-FU modificando la dosis de la administración; los resultados se describirán en el capítulo 4.

El reposicionamiento de fármacos constituye una buena estrategia terapéutica para la ELA debido a la inexistencia de un tratamiento efectivo y a la rapidez de la enfermedad. Como se ha comentado en la introducción, el 5-fluoracilo es un quimioterápico ampliamente empleado y estudiado en cáncer, sin embargo, apenas existen estudios de su acción en enfermedades neurodegenerativas, incluida la ELA, o en animales modelo de la enfermedad. Por otro lado, el empleo de Capecitabina, profármaco de 5-FU, como potencial terapia alternativa nos pareció muy interesante debido a que presenta una eficacia similar a la del 5-FU además de producir menor incidencia y una aparición tardía de efectos adversos. Esto es debido a que está diseñado para bioactivarse en los tejidos de manera que estén expuestos a concentraciones más reducidas de 5-FU, pero más prolongadas en el tiempo, reduciendo de este modo la toxicidad por un exceso de circulación sistémica del fármaco (Lam et al., 2016; Malet-Martino & Martino, 2002). Nuestros resultados de farmacocinética están en sintonía con estas características y con estudios realizados en otras cepas de ratones y rata (Kobuchi et al., 2018; Udofot et al., 2016).

Desde nuestro conocimiento, no hay estudios de Capecitabina en nuestro modelo animal. Después de comprobar que no producía toxicidad y que no modificaba significativamente la supervivencia en nuestro modelo, y, tras varias conversaciones con afectados de ELA y facultativos, decidimos no seguir profundizando en el estudio de la Capecitabina. Si bien la administración oral evita el traslado al hospital y los inconvenientes que ello supone, es cierto que este tipo de administración puede resultar muy complicada ya que los afectados de ELA suelen padecer disfagia, sobre todo los casos de inicio bulbar, llegando incluso a ser una administración no apropiada conforme progresa la enfermedad. Asimismo, el tratamiento seguramente sería diario y actualmente no existen fórmulas fácilmente solubles de este principio activo por lo que resultaría muy difícil el tratamiento sobre todo en estadios finales de la enfermedad.

La mayoría de los ensayos clínicos no han podido demostrar una eficacia clínica en el tratamiento de la ELA. Tal vez uno de los grandes inconvenientes que dificulta el éxito traslacional sea la incapacidad de los fármacos o moléculas para atravesar la barrera hematoencefálica y/o hematomedular. Estas barreras desempeñan un papel crucial en la protección del SNC, permiten el paso selectivo de nutrientes y pequeñas moléculas solubles en lípidos y limitan la entrada de patógenos o toxinas (Garbuzova-Davis & Sanberg, 2014). Sin embargo, este mecanismo de protección supone una barrera importante para la administración o efectividad de fármacos potencialmente terapéuticos para la ELA. Se cree que estas barreras dificultan la administración al SNC de más del 90% de los fármacos y de casi todos los productos

biológicos (G. Y. Wang et al., 2020). Por otro lado, se han demostrado alteraciones de estas barreras tanto en modelos animales como pacientes con ELA (Garbuzova-Davis & Sanberg, 2014; Winkler et al., 2014) y han sido reconocidas como un factor clave que posiblemente agrave el daño de las motoneuronas. En concreto, en el modelo SOD1G93A se demostraron alteraciones estructurales y funcionales en la etapa inicial de la enfermedad y como este daño se exacerbó con la progresión de la enfermedad. Es importante destacar que estas anomalías se encontraron antes de la degeneración de la motoneurona y la neuroinflamación (Garbuzova-Davis et al., 2007; Miyazaki et al., 2011).

Como se ha comentado previamente, apenas hay estudios en ELA con 5-FU y los que hay, son estudios *in vitro*. Nuestros resultados muestran la capacidad del fármaco de atravesar la barrera hematoencefálica, aunque serían necesarios más estudios para comprobar si es capaz de acumularse a concentraciones terapéuticas. Por el contrario, el 5-FU no fue detectado en músculo esquelético. Desde nuestro conocimiento, existen estudios que detectan el 5-FU en diferentes tejidos, pero no hemos encontrado ninguno que lo detecte en músculo esquelético. Sin embargo, un trabajo reciente sobre el 5-FU y la caquexia asociada a cáncer, muestra los efectos del fármaco sobre células inmunitarias infiltrantes y residentes del músculo esquelético (Vanderveen et al., 2020). Aunque nuestros resultados no muestran detección en músculo, no podemos asegurar que el 5-FU no es capaz de llegar a cuádriceps. Hipotetizamos varias razones al respecto. Primero, limitaciones en la técnica como el método de detección o la pauta temporal seguida. Segundo, tal vez el 5-FU sea capaz de llegar a cuádriceps, pero no se acumule en concentraciones suficientemente altas. Tercero, tal vez ejerza su acción sobre las células circulantes que terminarían produciendo modificaciones en su microambiente alterando la homeostasis del cuádriceps.

CAPÍTULO 4

Ensayo preclínico piloto con administración de
distintas dosis del fármaco 5-FU en el modelo animal

SOD1G93A

4. Ensayo preclínico piloto con administración de distintas dosis del fármaco 5-FU en el modelo animal SOD1G93A

Los resultados obtenidos con la administración de 5-Fluorouracilo a dosis 150 mg/kg fueron muy prometedores (Rando et al., 2019). A pesar de que la dosis de este fármaco no alcanzaba los niveles utilizados en su aplicación del tratamiento contra el cáncer, sería deseable una disminución de la misma si mostrase la misma efectividad. Por otra parte, también nos interesó conocer si una dosis más alta incrementaba el efecto del fármaco, siempre sin llegar a la dosis utilizada en quimioterapia. Por tanto, decidimos estudiar el efecto de otras dos nuevas dosis: 100 mg/kg y 200 mg/kg en el modelo animal.

El estudio y la administración de 5-Fluorouracilo se inició el día 70 de edad de los ratones, una etapa presintomática tardía en la que los animales aún no muestran características clínicas como pérdida de peso o función locomotora deteriorada pero ya poseen problemas motores detectados por electromiografía (Mancuso et al., 2014). Por otro lado, cabe destacar que una disminución del peso en los ratones transgénicos SOD1G93A se correlaciona con el estado de salud, de este modo, aquellos animales que muestran pérdidas ponderales más acusadas presentan estados más avanzados de la enfermedad.

Se efectuó un seguimiento de la longevidad y evolución del peso (Figura 5.15). Respecto a la supervivencia y, como se ilustra en la Figura 5.15A, el tratamiento con 5-FU a dosis 100 mg/kg, a pesar de no ser significativa, prolongó la longevidad más que el resto de los grupos (Tabla 5.6.). El análisis no mostró diferencias entre las dosis 200 mg/kg y 150 mg/kg, llegando incluso a vivir algo menos que el grupo control, resultados sorprendentes sobre todo para la dosis de 150 mg/Kg. En cuanto a la evolución del peso (Figura 5.15B), a pesar de no observarse una clara efectividad de ningún tratamiento, el grupo que experimentó menor progresión de pérdida de peso fue el tratado con 100mg/kg, llegando a existir una tendencia con la dosis 200 mg/kg al inicio de la fase sintomática temprana P91 ($p=0,07$).

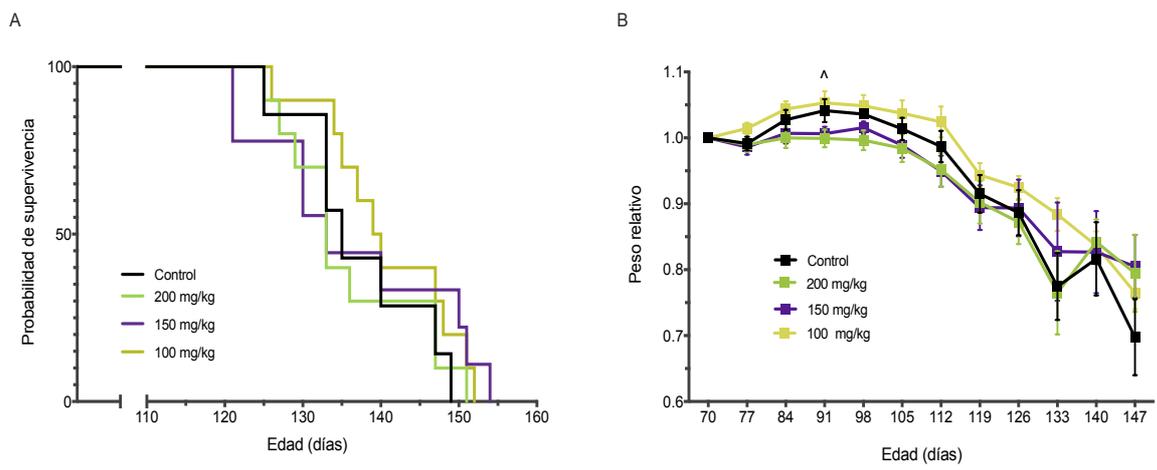


Figura 5.15. **Ensayo preclínico en animales SOD1G93A tratados con diferentes dosis de 5-FU.** (A) Supervivencia. (B) Evolución del peso corporal durante la progresión de la enfermedad. Los datos se muestran como peso relativo media \pm SEM. (ANOVA, \wedge $p < 0,1$). Control $n=7$, 200 mg/kg $n=10$, 150 mg/kg $n=9$, 100mg/kg $n=10$

Tabla 5.6. Supervivencia de ratones SOD1G93A tratados con diferentes dosis de 5-FU. Test Mantel-Cox Log-Rank.

| Grupo | Control | 200 mg/kg | 150 mg/kg | 100 mg/kg |
|-----------------|--------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
| Media \pm SEM | 137 \pm 3,2 días | 136 \pm 2,8 días | 136 \pm 4,42 días | 140 \pm 2,6 días |

| | 200 mg/Kg | 150 mg/Kg | 100 mg/Kg |
|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Control | 0,960 | 0,530 | 0,308 |
| 200 mg/Kg | - | 0,572 | 0,199 |
| 150 mg/Kg | 0,572 | - | 0,966 |

El estudio preliminar parecía indicar que la dosis de 100 mg/Kg resultaba más beneficiosa para la supervivencia y progresión de peso corporal, aunque no se observaron diferencias significativas en la longevidad de los animales respecto al control, debido posiblemente al reducido tamaño muestral empleado.

En vista de estos resultados y, considerando que la traslación a la clínica de potenciales terapias no solamente consiste en extender la supervivencia de los enfermos, sino que también pueda ser capaz de ralentizar la progresión de la enfermedad y mejorar la calidad de vida, realizamos un estudio preclínico incrementando el número de animales transgénicos SOD1G93A (19 controles y 18 tratados) para estudiar la posible eficacia de la nueva dosis de 100 mg/kg de

5-FU. El estudio comenzó el día 63 de edad entrenando a los animales para las pruebas funcionales, una semana antes del inicio del tratamiento. La pauta de administración fue la misma que en estudios previos, una inyección intraperitoneal cada quince días siendo un total de tres administraciones. Se realizaron un estudio de supervivencia y distintas pruebas funcionales que permitieran comprobar si el estado motor de los animales mejoraba con el tratamiento. El diseño experimental se realizó empleando sexos balanceados, tal como se recomienda en las guías para el uso de este modelo (Ludolph et al., 2010).

En la prueba funcional de **rotarod** (Figura 5.16), tanto los ratones control como los tratados fueron capaces de aguantar el máximo de tiempo, 180 segundos, hasta el día 84 de vida. A medida que la enfermedad progresa y se manifiestan signos de debilidad en las patas traseras, fueron obteniendo puntuaciones cada vez más bajas. A partir del día 91 y hasta el día 105, el grupo tratado presentó menor capacidad motora y latencia de caída que el grupo control. Sin embargo, a partir del día 105 los animales tratados mostraron mejor coordinación motora y mayor latencia de caída que el grupo control. En un intento de establecer un punto de afectación neuromuscular, se estableció el momento en el que el ratón no era capaz de aguantar 180 segundos en la prueba, interpretándose que aquellos ratones que obtenían una puntuación inferior a esa, presentaban afectación neuromuscular. En el caso del grupo control, la media de tiempo en alcanzar dicho estado aconteció el día 109, mientras que en el grupo tratado se prolongó tres días más, alcanzándose el día 112 (Mantel-Cox Log-Rank $p=0,432$) (Figura 5.16B); sin embargo, de nuevo no se encontraron diferencias significativas.

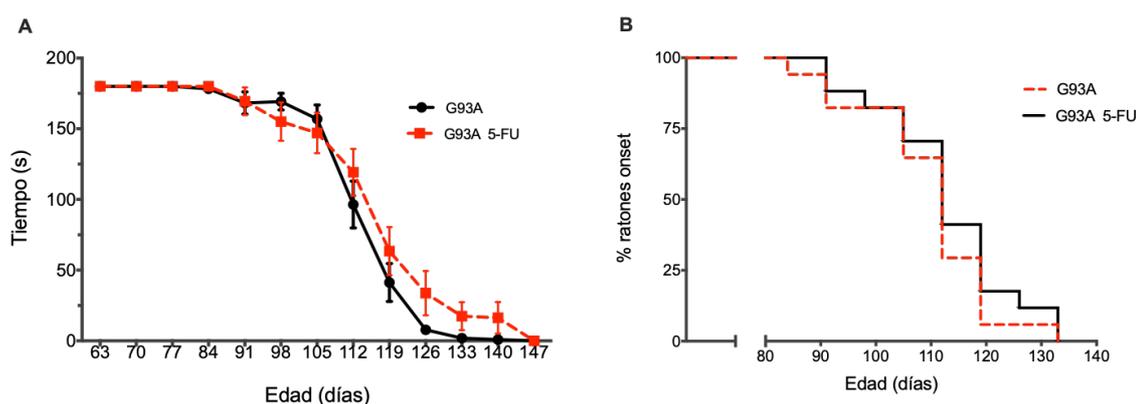


Figura 5.16. **Prueba funcional de rotarod de animales SOD1G93A tratados con 5-FU (100 mg/kg).** (A) Evolución de la coordinación motora durante el desarrollo de la enfermedad. El grupo tratado se muestra con línea roja y su control con línea negra. Los valores se muestran como media \pm SEM (B) Tiempo medio en alcanzar un nivel de afectación neuromuscular (< 180 segundos) ($112 \pm 2,9$ vs $109 \pm 2,9$ días; test Mantel-Cox Log-Rank $p=0,432$).

En la prueba de **open field** o campo abierto (Figura 5.17), el grupo tratado mostró hiperlocomoción durante todo el transcurso de la enfermedad, siendo más evidente y existiendo marcadas diferencias en las etapas presintomática tardía P78 ($p=0,03$), sintomática temprana P93 ($p=0,004$) y sintomática P108 ($p=0,034$) (Figura 5.17A). Un resultado parecido se observó en la distancia recorrida en la zona centro (Figura 5.17B), donde el grupo tratado mostró mayor actividad que el grupo control, resultando las diferencias significativas desde la fase presintomática tardía P78 ($p=0,014$) hasta estadios muy avanzados de la enfermedad ($p < 0,05$). Dada la tendencia natural de los ratones a recorrer los bordes del campo y evitar áreas abiertas más expuestas, como es la zona centro, estos datos indicarían una menor respuesta ansiogénica de los animales tratados con 5-FU. Un registro representativo del recorrido realizado durante el transcurso del estudio esta mostrado en la (Figura 5.17C).

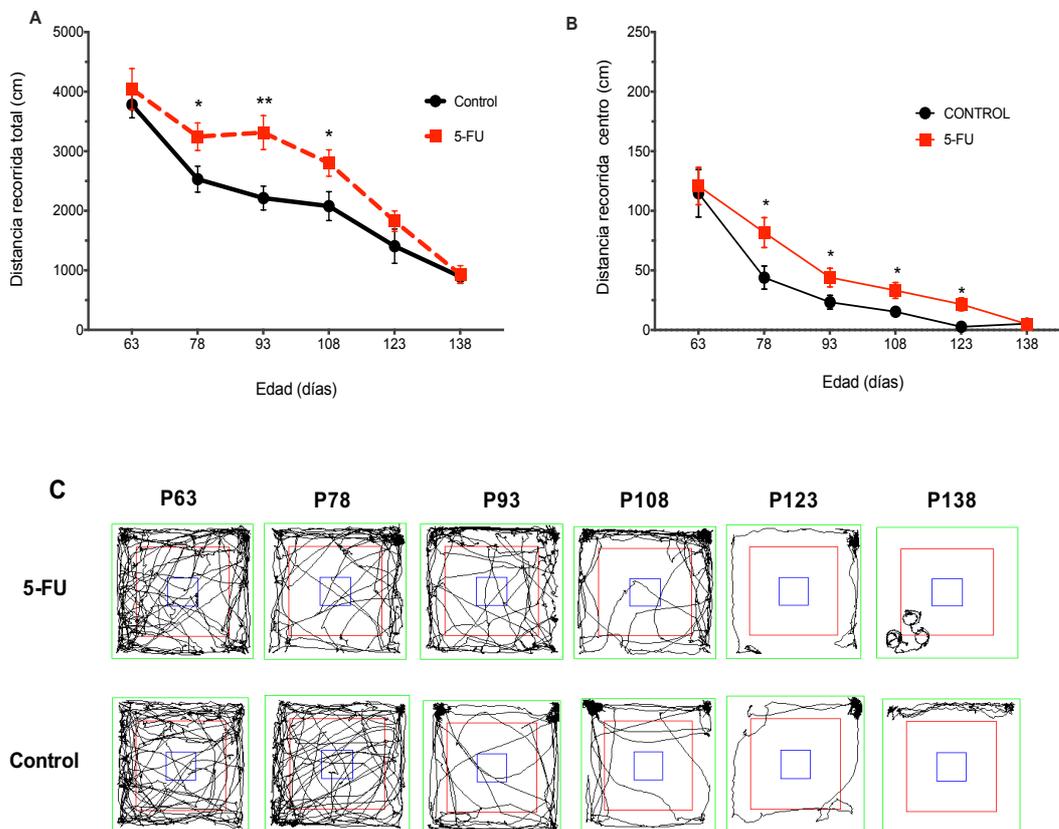


Figura 5.17. Prueba de campo abierto de animales SOD1G93A tratados con 5-FU (100 mg/kg). (A) Distancia total recorrida. (B) Distancia recorrida en el centro. Los datos se expresan como distancia media \pm SEM. t-student; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. (C) Registro del recorrido representativo realizado durante el desarrollo de la enfermedad.

Por otro lado, el tratamiento con la dosis 100 mg/kg no mostró eficacia en cuanto a la **longevidad** de los animales (Figura 5.19A). En el grupo de ratones control, la primera muerte se produjo el día 126 y la última el día 151. En el caso del grupo tratado con el 5-FU, la primera y última muerte se produjeron los días 120 y 154 respectivamente. Además, el análisis de supervivencia no mostró diferencias significativas en la media de edad, teniendo mayor supervivencia el grupo control ($137 \pm 1,5$ vs $135 \pm 2,1$ días; Mantel-Cox Log-Rank $p=0,759$). En cuanto a la evolución del peso (Figura 5.19B), los animales control alcanzaron el pico de peso corporal el día 91 de vida, mientras que los ratones tratados con 5-FU continuaron ganando peso hasta el día 105. Sin embargo, a pesar de comenzar la fase de adelgazamiento dos semanas más tarde, los ratones tratados mostraron cifras de peso corporal inferiores a los controles desde el día 77, siendo significativa la diferencia a día 119 ($p= 0,038$).

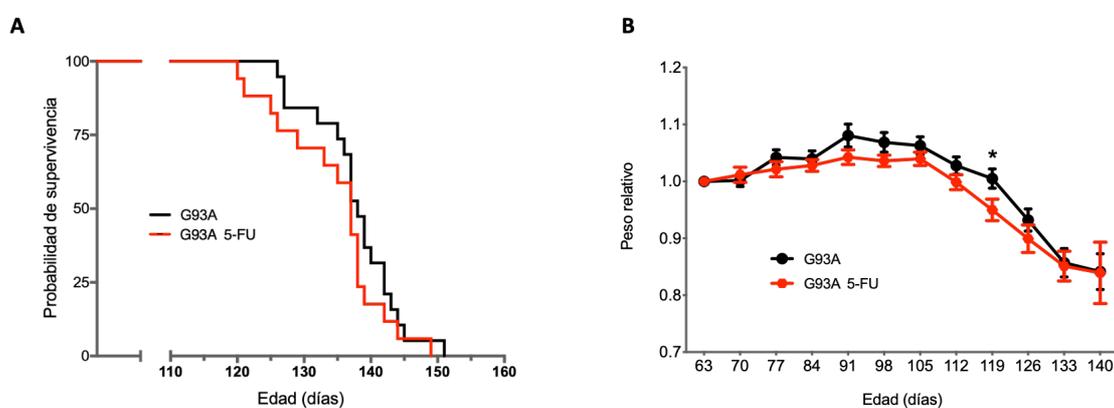


Figura 5.19. **Supervivencia y evolución del peso de ratones SOD1G93A tratados con 5-FU (100 mg/kg).** (A) Supervivencia de animales tratados (línea roja) y sus controles (línea negra) ($137 \pm 1,5$ vs $135 \pm 2,1$ días; Mantel-Cox Log-Rank $p=0,759$) (B) Evolución del peso corporal. Los datos se expresan como media \pm SEM t-student; * $p<0.05$.

Debido a las diferencias significativas existentes entre grupos en algunas pruebas y, como este modelo animal se caracteriza por diferencias dependientes del sexo tanto en desarrollo como supervivencia (Ludolph et al., 2010; Oliván, Calvo, et al., 2014), realizamos un análisis de la efectividad del 5-FU a 100 mg/kg en función del sexo (grupo control: 9 machos, 10 hembras; grupo tratado: 8 machos, 10 hembras).

En la prueba funcional de **rotarod** (Figura 5.20), el tratamiento no resultó efectivo en la mejora de la capacidad locomotora de los machos (Figura 5.20A), observándose menor coordinación motora y latencia de caída de los animales tratados respecto a los animales control a partir del inicio de los síntomas (P91) y hasta el final del ensayo. Sin embargo, las hembras tratadas mostraron mayor coordinación y latencia de caída desde el día 84 y hasta el final de la

enfermedad (Figura 5.20B). Respecto al inicio de afectación neuromuscular, los machos tratados alcanzaron ese momento 9 días antes que el grupo control ($103 \pm 3,9$ vs $112 \pm 5,1$ días; test Mantel-Cox Log-Rank $p=0,158$) (Figura 5.20C). En las hembras (Figura 5.20D), el tratamiento mostró diferencias significativas entre los grupos ya que el inicio de afectación neuromuscular del grupo control sucedió el día 107 y el del grupo tratado se prolongó 12 días más, hasta el día 119 de edad ($107 \pm 3,6$ vs $119 \pm 2,6$ días; test Mantel-Cox Log-Rank $p=0,015$).

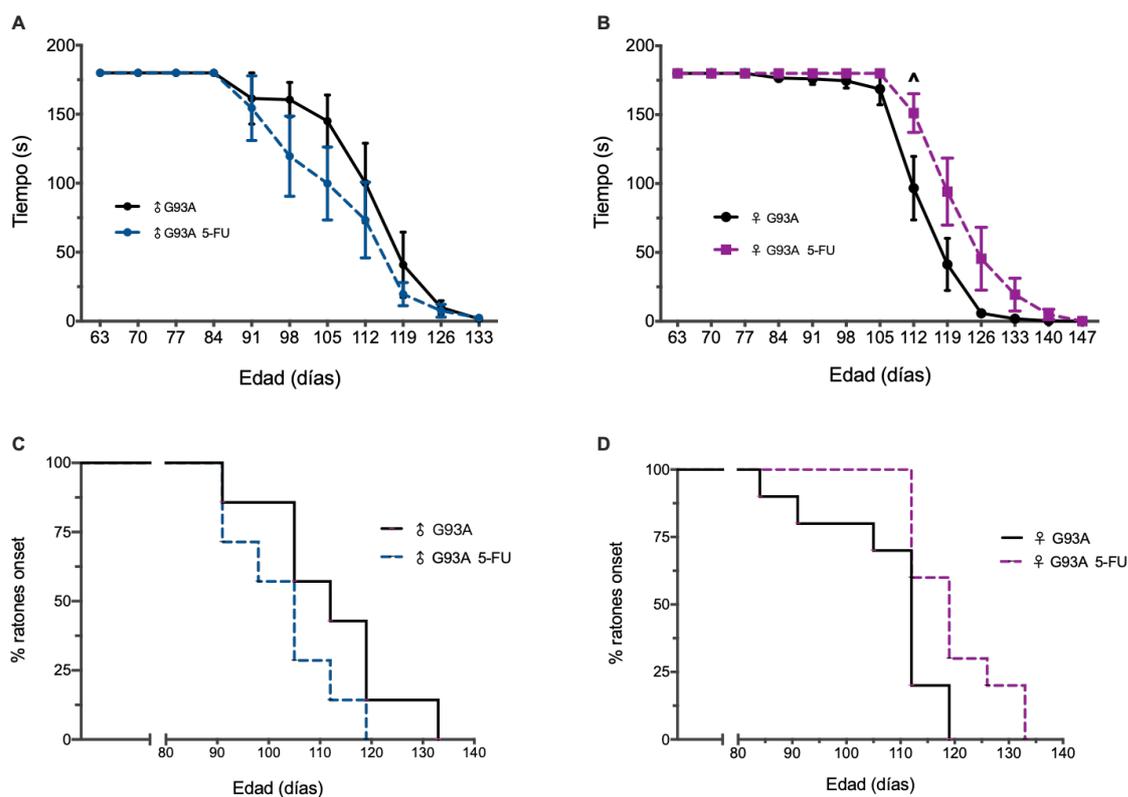


Figura 5.20. **Prueba funcional de rotarod de animales SOD1G93A tratados con 5-FU (100 mg/kg) en función del sexo.** Evolución de la coordinación motora durante el desarrollo de la enfermedad de (A) machos y (B) hembras. Los datos se muestran como tiempo medio \pm SEM ($^{\wedge}p=0,07$, t-student). Tiempo medio en alcanzar un nivel de afectación neuromuscular (< 180 segundos) de (C) machos ($103 \pm 3,9$ vs $112 \pm 5,1$ días; Mantel-Cox Log-Rank $p=0,158$) y (D) hembras ($107 \pm 3,6$ vs $119 \pm 2,6$ días; Mantel-Cox Log-Rank $p=0,015$).

En la prueba de **campo abierto** (Figura 5.21), los animales tratados de ambos sexos mostraron mayor locomoción que sus respectivos controles durante todo el transcurso de la enfermedad. Los machos (Figura 5.21A) presentaron diferencias significativas en la etapa sintomática ($p=0,046$) y las hembras (Figura 5.21B) una tendencia en las etapas presintomática tardía (P78), sintomática temprana (P93) y sintomática (P108). Si atendemos a la zona centro, los machos tratados (Figura 5.21C) mostraron mayor actividad desde el comienzo de la prueba

hasta estadios muy avanzados (P123), haciéndose más evidente en la etapa presintomática tardía ($p=0,013$); además, mostraron menor respuesta ansiogénica que sus controles. En cuanto a las hembras (figura 5.21D), la actividad del grupo tratado varía durante el desarrollo de la enfermedad, mostrando mayor locomoción en la etapa presintomática tardía (P78) y terminal (P123), aunque estas diferencias no resultaron significativas.

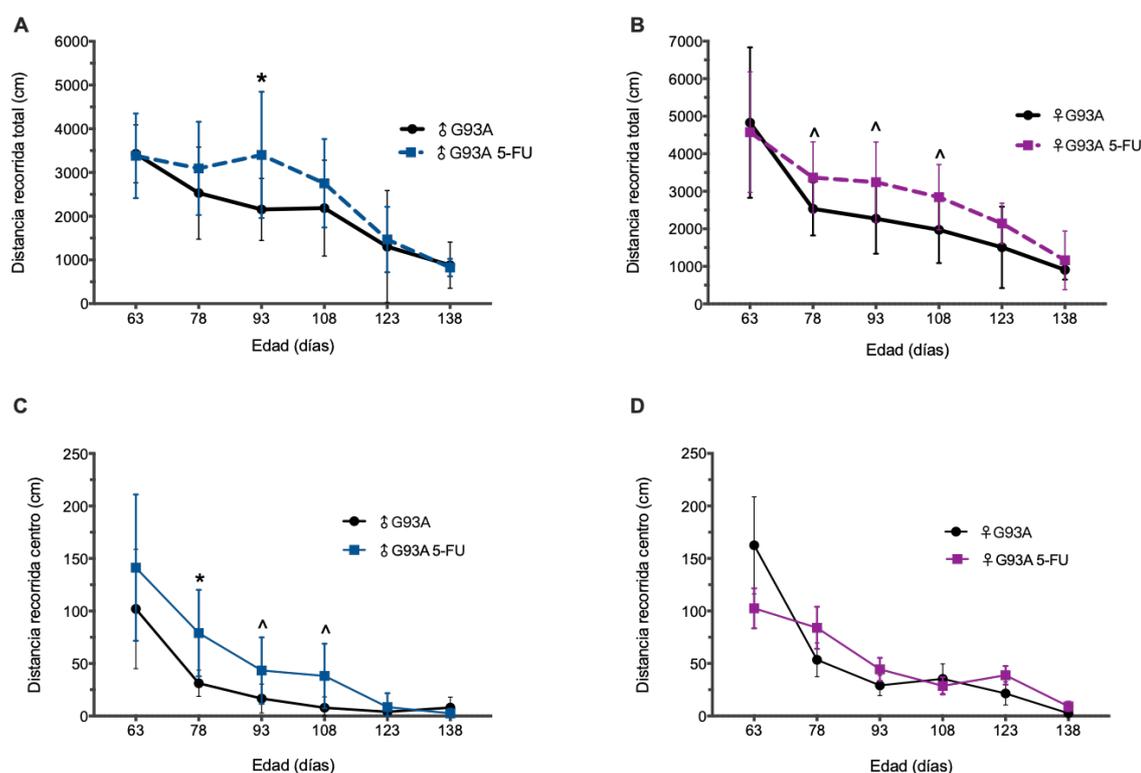


Figura 5.21. Prueba de campo abierto de animales SOD1G93A tratados con 5-FU (100 mg/kg) en función del sexo. Distancia recorrida total de (A) machos y (B) hembras. Distancia recorrida en el centro de (C) machos y (D) hembras. Los datos se expresan como media distancia \pm SEM; t-student, * $p < 0,05$; ^ $p < 0,1$.

Respecto a la **evolución del peso** durante la progresión de la enfermedad (Figura 5.22), el tratamiento no ralentizó la pérdida de peso en ningún sexo, al igual que lo observado en los datos con sexos juntos. Los machos tratados con 5-FU mostraron desde el día 77 de edad mayor pérdida de peso que sus controles, siendo más evidente esta diferencia en las etapas finales (Figura 5.22A). En el caso de las hembras (Figura 5.22B), el grupo tratado mostró una progresión más irregular, teniendo tasas ponderales inferiores desde el día 70 pero llegando a igualar al grupo control en varios puntos. En general, el tratamiento no fue efectivo en la demora de la fase de adelgazamiento.

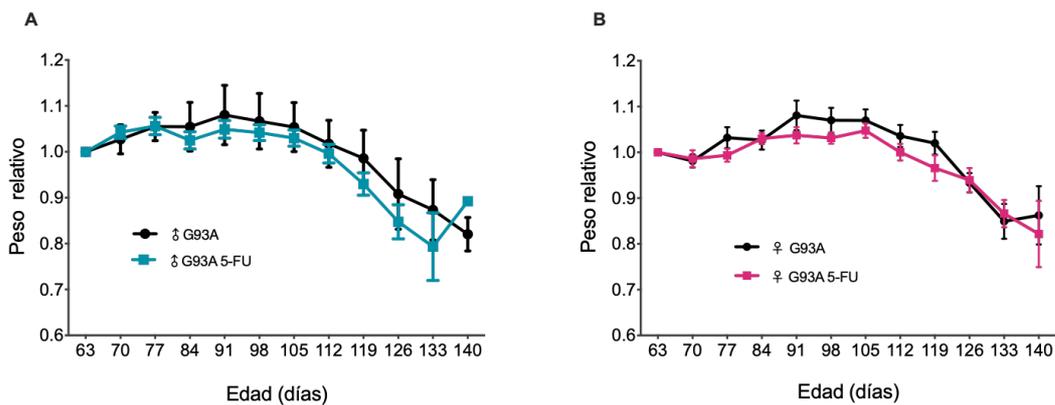


Figura 5.22. **Evolución del peso corporal de animales SOD1G93A tratados con 5-FU (100 mg/kg) en ambos sexos.** (A) Peso de machos tratados (línea azul) respecto a sus controles (línea negra) (B) Peso de hembras tratadas (línea rosa) y sus controles (línea negra). Los datos se muestran como media \pm SEM.

En cuanto a la **longevidad** de los animales, el 5-FU mostró ciertas diferencias dependientes del sexo. En los machos (Figura 5.23A), la primera muerte en el grupo control se produjo el día 127 y la última el día 151. Sin embargo, en el caso del grupo tratado, tanto la primera como última muerte se produjeron antes, el día 120 y 149 respectivamente. El análisis de supervivencia no mostró efectividad del fármaco, siendo la media de supervivencia del grupo control $137 \pm 2,6$ y la del grupo tratado $131 \pm 3,1$ días (Mantel-Cox Log-Rank $p=0,177$). Respecto a las hembras (Figura 5.23B), en el grupo control la primera muerte se produjo el día 126 de vida y la última el día 145. Sin embargo, en el caso del grupo tratado la primera y última muerte se produjeron varios días más tarde, los días 137 y 154 respectivamente. El análisis de supervivencia mostró una media de supervivencia algo más prolongada pero no significativa para el grupo tratado con 5-FU ($137 \pm 1,7$ vs $140 \pm 1,8$ días; test Mantel-Cox Log-Rank $p=0,523$).

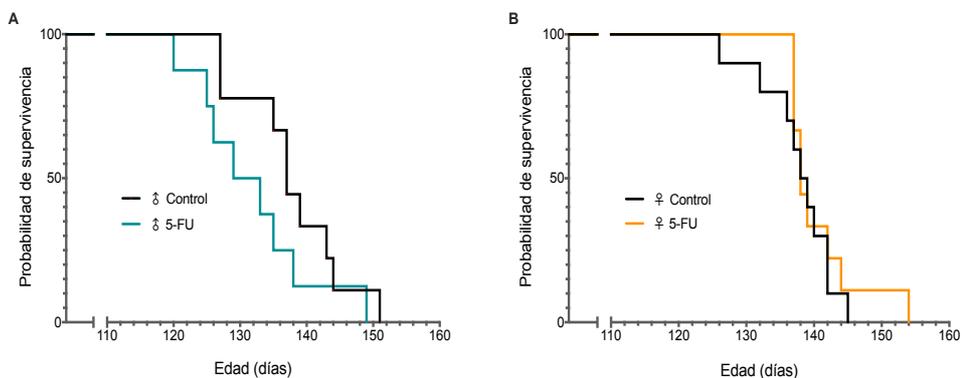


Figura 5.23. **Supervivencia de animales SOD1G93A de ambos sexos tras la administración de 5-FU (100mg/Kg).** (A) Los machos tratados se muestran con línea azul y los machos control con línea negra. ($131 \pm 3,1$ vs $137 \pm 2,6$ días (Mantel-Cox Log-Rank $p=0,177$)) (B) Las hembras tratadas se muestran con línea naranja y las hembras control con línea negra ($137 \pm 1,7$ vs $140 \pm 1,8$ días; test Mantel-Cox Log-Rank $p=0,523$).

La ELA es una de las enfermedades neurodegenerativas más devastadora y con peor pronóstico vital. Actualmente no existe ningún tratamiento eficaz que modifique su curso clínico; la gran heterogeneidad de la enfermedad y los escasos avances terapéuticos hacen necesaria la búsqueda de nuevas terapias que puedan cambiar el curso de la enfermedad o, al menos, retrasar su progresión. El reposicionamiento de fármacos es un enfoque emergente en la búsqueda de nuevos usos terapéuticos de fármacos ya existentes. En este sentido, la genética molecular y la evidencia biológica apoyan el hecho de la existencia de una superposición entre neurodegeneración y cáncer. El vínculo común entre los mecanismos de señalización y los genes implicados en la regulación de diversas funciones celulares aboga por la reutilización de fármacos oncológicos en la neurodegeneración (Advani et al., 2020). Uno de los aspectos positivos que encontramos en el estudio con 5-FU es que en el supuesto que mostrase eficacia, dado que es un quimioterápico usado ampliamente en clínica, el planteamiento de un posible ensayo clínico se vería probablemente facilitado. A pesar de tratarse de un antineoplásico ampliamente utilizado tiene importantes efectos secundarios adversos como cardiotoxicidad, mielosupresión y toxicidad gastrointestinal. La búsqueda de menores dosis, pero con una efectividad como mínimo igual a la observada inicialmente, se planteó como una buena estrategia ya que de esta manera en parte se minimizarían sus efectos secundarios, algo que resultaría muy positivo para los afectados de ELA.

Los resultados mostraron como una dosis de 5-FU superior (200 mg/kg) a la original resultó menos favorable que las otras dos estudiadas. Esto podría ser debido a una falta de recuperación de la aplasia medular generada por el 5-FU o a la posible mucositis intestinal generada, aunque no observamos signos de toxicidad en los animales potencialmente atribuibles a esta dosis de 5-FU. Por el contrario, la dosis inferior (100 mg/kg) parecía resultar más beneficiosa, tal vez debido a los menores efectos secundarios que se puedan producir ya que se ha demostrado una relación dosis-toxicidad (Zhang et al., 2018).

Los estudios preclínicos son un paso importante para aumentar la probabilidad de identificar fármacos que puedan ser también eficaces en el entorno clínico. Una de las dificultades al realizar preclínicos es el diseño adecuado del mismo para evitar dar lugar a posibles errores de interpretación. Para la evaluación de la eficacia de la nueva dosis que se mostró más beneficiosa en el estudio piloto, seguimos las recomendaciones para la investigación animal preclínica en ELA (Ludolph et al., 2010), empleando un tamaño muestral adecuado con sexos balanceados y hermanos de camada en todos los cohortes experimentales. Esta consideración es especialmente importante cuando se emplea un animal con fondo híbrido,

como es nuestro caso, ya que los hermanos de la misma camada tienen más probabilidades de tener edades similares de aparición y muerte que los no hermanos (Scott et al., 2008).

En el ensayo preclínico no se reprodujeron los efectos observados en el ensayo piloto y contradicen a los obtenidos en el primero. El 5-FU a dosis 100 mg/kg no tuvo un efecto favorable en el ratón SOD1G93A, aunque mostró cierta efectividad diferente en función del sexo, resultando algo mejor en las hembras, aunque sin observarse un incremento en la supervivencia de las mismas. El tratamiento con 100 mg/kg no retrasó el inicio de los síntomas ni la progresión de la enfermedad, evaluado a través de distintas pruebas funcionales. En la única prueba donde el grupo tratado mostró mejoría respecto al control fue en el test de campo abierto, donde los animales tratados mostraron hiperlocomoción y menor conducta ansiogénica. Asimismo, tampoco mostró efectividad sobre la longevidad de los animales independientemente del sexo, contradiciendo los resultados preliminares obtenidos en el estudio de diferentes dosis expuesto al principio de este capítulo.

La discrepancia en los resultados entre los estudios posiblemente se deba al reducido tamaño muestral empleado en el estudio piloto. Podemos asegurar que es importante elegir un tamaño muestral adecuado antes de realizar cualquier estudio utilizando este modelo animal para que los resultados sean representativos y no lleven a una interpretación errónea de los resultados.

CAPÍTULO 5

Influencia del ambiente experimental en el modelo
SOD1G93A tras el tratamiento con 5-FU.

5.- Influencia del ambiente experimental en el modelo SOD1G93A tras el tratamiento con 5-FU.

El primer estudio con el fármaco 5-Fluorouracilo a dosis 150 mg/kg (Rando et al., 2019) fue realizado en el antiguo animalario de la Facultad de Veterinaria; los resultados mostraron un efecto terapéutico del 5-FU sobre la esperanza de vida y la progresión de la enfermedad, además de mejorar el rendimiento motor de los animales. Debido a los resultados inesperados descritos en el capítulo anterior, en el que el 5-FU no mostró efectividad en ninguna de las dosis en el estudio piloto y tampoco con la dosis de 100 mg/kg, se volvió a realizar un nuevo estudio con la dosis original (150 mg/kg) para comprobar la efectividad del fármaco en el modelo animal en las nuevas condiciones, ya que los animales provenían del animalario nuevo. Por tanto, a lo largo de este capítulo se van a desarrollar los estudios realizados con el 5-FU en el modelo animal SOD1G93A en función de las diferentes zonas ambientales de origen.

Un primer grupo de animales, al que llamaremos “nave 49”, provenía del animalario antiguo de la Facultad de Veterinaria; los animales nacieron y fueron criados en ese ambiente, permaneciendo allí hasta el final del estudio. El segundo grupo provenía de la zona SPF (Specific Pathogen Free) del animalario nuevo (CIBA), los animales nacieron y fueron criados en esa zona hasta el destete, posteriormente, fueron alojados en la zona convencional del animalario donde permanecieron hasta el final del estudio. Por último, el tercer grupo provenía de la zona convencional del animalario nuevo (CIBA), los animales nacieron y fueron alojados en esa zona hasta el final del estudio.

En los diferentes ambientes los animales tuvieron comida y bebida *ad libitum*, bajo ciclos de luz y oscuridad de 12 horas en unas condiciones ambientales de temperatura (21-23°C) y humedad (55%) controladas. Sin embargo, las diferentes zonas difieren en algunas características que se muestran en la Tabla 5.7.

Tabla 5.7. Características de los distintos ambientes experimentales.

| | Nave 49 | Convencional | SPF |
|----------------------|---|---|---|
| Estado sanitario | Animales sin sintomatología clínica | Animales sin sintomatología clínica | Zona máxima barrera estado sanitario |
| Esterilidad total | No | No | Sí |
| Acceso animales | Animales de procesos experimentales | Animales de procesos experimentales | Rederivación sanitaria o SPOF (Specific and opportunistic Pathogen) |
| Alojamiento animales | Cubeta convencional con filtro cobertor | Cubeta convencional con filtro cobertor | Cubeta individual ventilada (IVC) |
| Manejo animales | No cabina | No cabina | Cabina flujo laminar |
| Controles sanitarios | no perfil SPOF | perfil SPOF | perfil SPOF |
| Acceso | No restringido (personal y usuarios animalario) | No restringido (personal y usuarios animalario) | Restringido (solo personal animalario) |
| Agua | corriente | Osmotizada y autoclavada | Osmotizada y autoclavada |

En los diferentes estudios se emplearon ratones de ambos sexos y se hicieron grupos de animales control y tratados para cada zona de origen (Tabla 5.8). El tamaño muestral más elevado en la zona Nave 49 y SPF es debido a que se realizaron 2 experimentos por separado.

Tabla 5.8. Animales SOD1G93A provenientes de diferentes ambientes empleados en los estudios.

| | Nave 49 | | Zona convencional | | Zona SPF | |
|-----------|----------------|-------------|--------------------------|-------------|-----------------|-------------|
| | Control | 5-FU | Control | 5-FU | Control | 5-FU |
| n machos | 16 | 16 | 10 | 10 | 19 | 20 |
| n hembras | 13 | 12 | 8 | 6 | 20 | 18 |
| n total | 29 | 28 | 18 | 16 | 39 | 38 |

5.1.- Ambiente “nave 49”

Como se ha comentado al principio de este capítulo, el primer estudio con el 5-FU se realizó en la nave 49 del antiguo animalario (Rando et al., 2019). El análisis de supervivencia mostró como el 5-FU prolongó muy significativamente la media de supervivencia del grupo tratado respecto al grupo control ($135 \pm 1,7$ vs $129 \pm 1,4$ días, Mantel-Cox Log Rank $p=0,008$) (Figura 5.24A). Asimismo, mostró efectividad en la evolución del peso corporal (Figura 5.24B); a pesar de sufrir una pérdida de peso leve (no significativa) después de la primera administración, los ratones tratados se recuperaron a la semana siguiente y mostraron menor pérdida de peso que el grupo control durante toda la etapa sintomática. A partir del día 117, el grupo control experimentó mayor pérdida de peso mientras que el grupo tratado conservó su peso inicial hasta los 124 días ($p=0,014$).

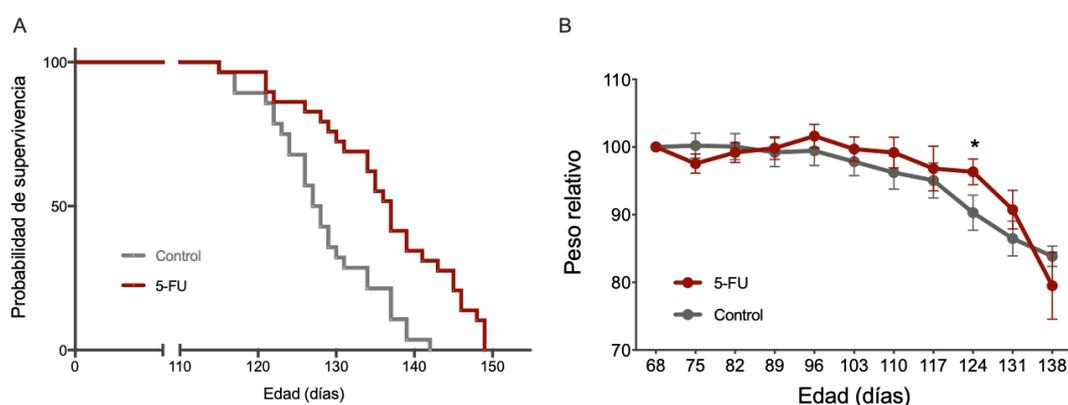


Figura 5.24. **Supervivencia y evolución del peso de ratones SOD1G93A tratados con 5-FU (150 mg/kg) procedentes de “nave 49”.** (A) Supervivencia de animales tratados (línea granate) y sus controles (línea gris) ($135 \pm 1,7$ vs $129 \pm 1,4$ días, Mantel-Cox Log Rank $p=0,008$) (B) Evolución de peso de animales tratados (línea granate) y sus controles (línea gris). Los datos de peso corporal se expresan como media \pm SEM; t-student; * $p < 0,05$

Si analizamos la supervivencia en función del sexo (Figura 5.25), el fármaco prolongó significativamente la longevidad de los machos tratados respecto de sus controles ($128 \pm 1,7$ vs $137 \pm 2,4$ días, Mantel-Cox Log Rank $p = 0,002$) (Figura 5.25A). En el caso de las hembras, aunque parecía que el 5-FU también prolongaba la longevidad del grupo tratado, estas diferencias no fueron significativas ($129 \pm 2,6$ vs $134 \pm 2,5$ días, Mantel-Cox Log Rank $p=0,264$) (Figura 5.25B). En la evolución del peso durante el desarrollo de la enfermedad, aunque los machos tratados mostraron una pérdida de peso tras la primera administración del 5-FU, en el comienzo de la fase sintomática recuperaron el peso original y además tuvieron mayores incrementos de peso hasta el final del estudio, sobre todo a día 110 ($p=0,01$) (Figura 5.25C). Sin embargo, las hembras mostraron tasas ponderales muy parecidas durante las primeras fases de la enfermedad (Figura

5.25D). A partir del día 110, el grupo tratado mostró una pérdida de peso que recuperó tras dos semanas (día 124); por el contrario, el grupo control experimentó una pérdida de peso de más del 10%. A pesar de las diferencias, estas no resultaron significativas.

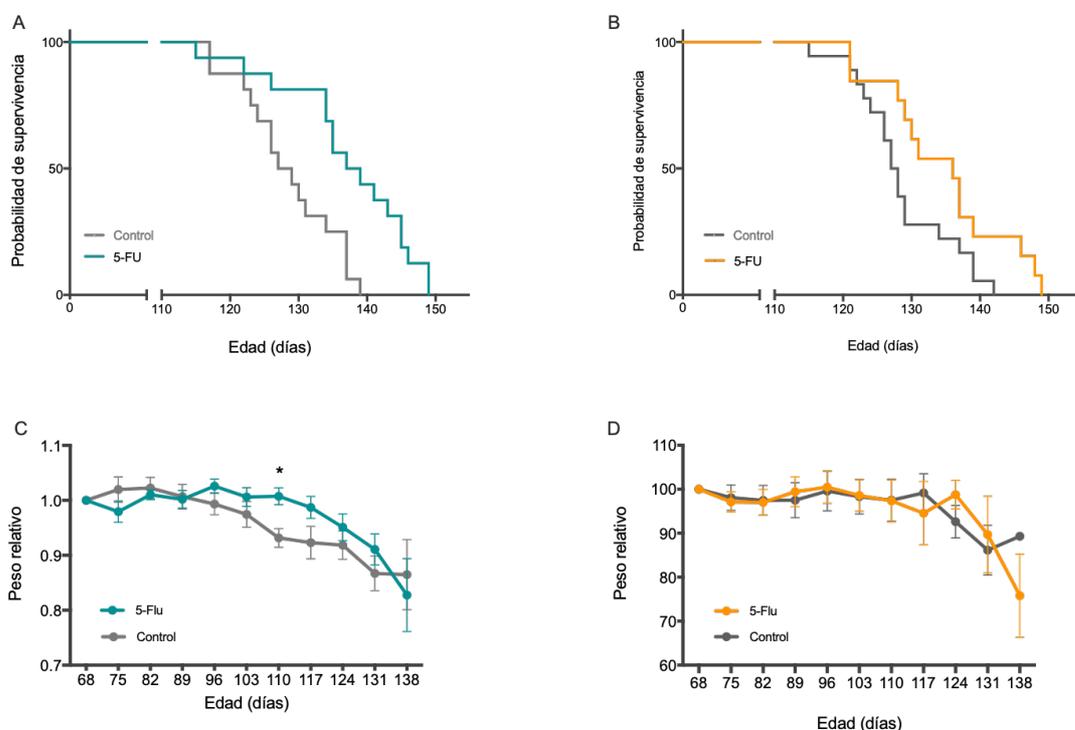


Figura 5.25. **Supervivencia y evolución de peso de animales SOD1G93A tratados con 5-FU (150mg/kg) procedentes de nave 49 en función del sexo.** (A) Supervivencia de machos tratados con 5-FU (línea azul y sus controles (línea gris) ($128 \pm 1,7$ vs $137 \pm 2,4$ días, Mantel-Cox Log Rank $p = 0,002$) y (B) de hembras tratadas (línea naranja) y sus controles (línea gris) ($129 \pm 2,6$ vs $134 \pm 2,5$ días, Mantel-Cox Log Rank $p=0,264$) (C) Evolución de peso corporal de machos tratados con 5-FU (línea azul) y sus controles (línea gris) y (D) de hembras tratadas (línea naranja) y sus controles (línea gris). Los datos de peso corporal se expresan como media \pm SEM; t-student; * $p < 0.05$.

5.2.- Zona SPF (Specific Pathogen Free)

Este estudio comenzó el día 70 de edad de los ratones, momento de inicio del tratamiento. Como se ilustra en la Figura 5.26A, el fármaco administrado a la dosis original (150 mg/kg) no mostró efectividad en la supervivencia de los animales. El análisis mostró una media de supervivencia mayor para el grupo control, aunque las diferencias no fueron significativas (136 ± 2 vs $134 \pm 2,1$ días, Mantel-Cox Log Rank $p = 0,464$). En cuanto a la evolución del peso (Figura 5.2B), el fármaco no ralentizó la pérdida de peso del grupo tratado, mostrando cifras de peso corporal inferiores al grupo control desde los 14 días posteriores al inicio del tratamiento y hasta el final del estudio, resultando estas diferencias significativas en la etapa sintomática P91

($p = 0,010$), sintomática tardía P112 ($p=0,032$) y muy significativas a los 98 días ($p = 0,001$) y 105 días ($p=0,003$) (Figura 5.26B).

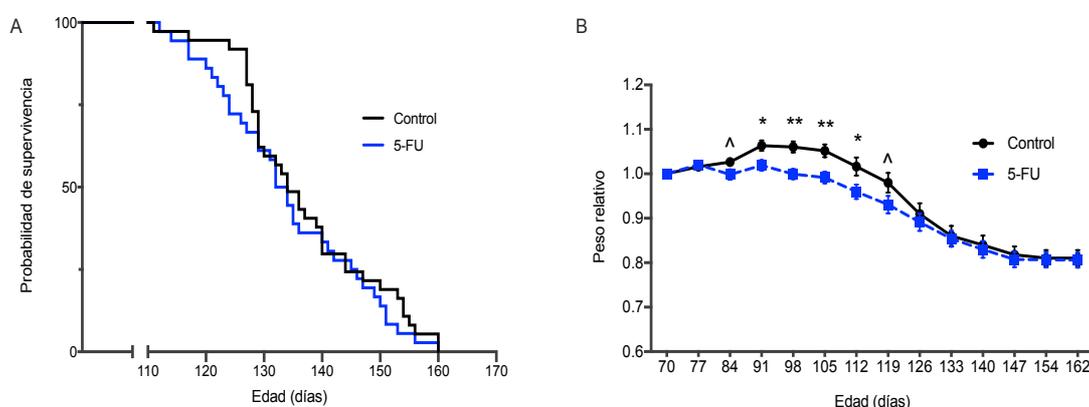


Figura 5.26. **Supervivencia y evolución de peso de animales SOD1G93A tratados con 5-FU (150mg/kg) procedentes de la zona SPF.** (A) Supervivencia de animales tratados (línea azul) y sus controles (línea negra) (136 ± 2 vs $134 \pm 2,1$ días, Mantel-Cox Log Rank $p = 0,464$) (B) Evolución de peso de animales tratados (línea azul) y sus controles (línea negra). Los datos de peso corporal se expresan como media \pm SEM; t-student; $\wedge p < 0,1$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Si analizamos en función del sexo, tampoco se observaron efectos beneficiosos del 5-FU. En los machos, la media de supervivencia del grupo control fue superior a la del grupo tratado ($132 \pm 2,8$ vs $130 \pm 2,7$ días, Mantel-Cox Log Rank $p = 0,636$) (Figura 5.27A). Aunque las hembras viven más que los machos, una de las características de este modelo animal, el 5-FU no mostró mejora en la media de supervivencia del grupo tratado respecto del grupo control ($139 \pm 2,9$ vs $140 \pm 2,6$ días, Mantel-Cox Log Rank $p = 0,572$) (Figura 5.27B). Respecto a la evolución del peso de los machos (Figura 5.27C), el grupo tratado mostró mayor pérdida de peso durante todo el estudio, produciéndose diferencias significativas entre los dos grupos a los 91 ($p = 0,020$) y 105 días ($p = 0,024$) y muy significativas a los 98 días ($p = 0,003$). En cuanto a las hembras, el grupo tratado también mostró cifras de peso corporal inferiores al grupo control desde el día 78 hasta el día 119, existiendo diferencias significativas cinco días después de la última administración del fármaco, a los 105 días ($p = 0,038$) (Figura 5.27D). A partir del día 119 y hasta el final del estudio, la progresión de la pérdida de peso se iguala entre ambos grupos.

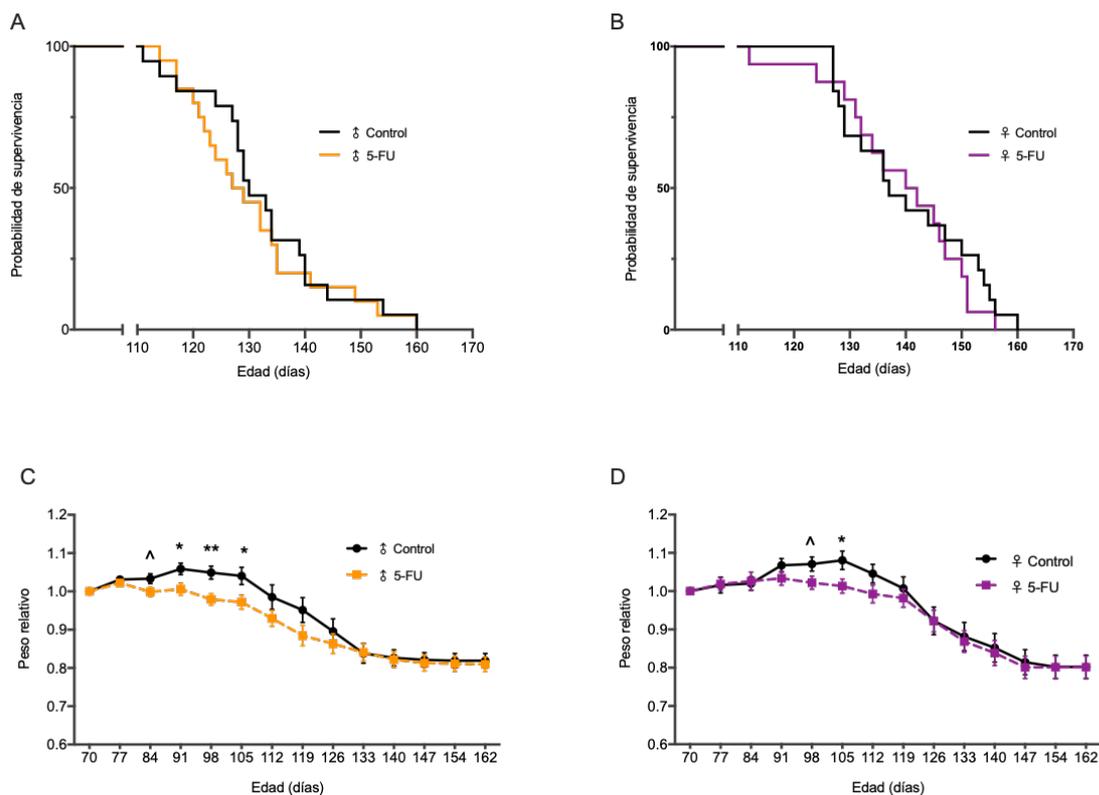


Figura 5.27. **Supervivencia y evolución de peso de animales SOD1G93A tratados con 5-FU (150mg/kg) procedentes de la zona SPF en función del sexo.** (A) Supervivencia de machos tratados con 5-FU (línea naranja) y sus controles (línea negra) ($132 \pm 2,8$ vs $130 \pm 2,7$ días, Mantel-Cox Log Rank $p = 0,636$) y (B) de hembras tratadas (línea morada) y sus controles (línea negra) ($139 \pm 2,9$ vs $140 \pm 2,6$ días, Mantel-Cox Log Rank $p = 0,572$) (C) Evolución de peso corporal de machos tratados con 5-FU (línea naranja) y sus controles (línea negra) y (D) de hembras tratadas (línea morada) y sus controles (línea negra). Los datos de peso corporal se expresan como media \pm SEM; t-student; ^ $p < 0,1$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Debido a estos resultados, que no se repetían con los anteriores, nos planteamos la posibilidad de que existiera algo que pudiera estar influyendo o modificando la efectividad del fármaco en nuestro modelo animal. La única diferencia era el ambiente del que procedían, que en un caso era libre de patógenos y en la nave 49 no. Por ello, realizamos un nuevo estudio, pero esta vez con animales procedentes de la zona experimental del animalario porque, como se puede observar en la tabla 5.8, difiere en ciertas características con la zona SPF como no ser un ambiente totalmente estéril.

5.3.- Zona convencional

Este estudio, al igual que el de zona SPF, comenzó a los 70 días de edad de los ratones, momento de inicio del tratamiento con 5-FU. Como se puede observar en la Figura 5.28A, aunque se apreciaron diferencias en los animales de muerte temprana, posteriormente ambas líneas de supervivencia se superponen. Al contrario de lo observado en el estudio de SPF, el tratamiento parecía prolongar la media de supervivencia del grupo tratado, aunque estas diferencias no fueron significativas ($133 \pm 1,9$ vs $131 \pm 2,3$ días; Mantel-Cox Log Rank $p=0,576$). En lo referente a la evolución del peso corporal (Figura 5.28B), el grupo tratado con 5-FU mostró menor peso durante todo el desarrollo de la enfermedad, sobre todo en las 4 semanas posteriores al inicio del tratamiento, produciéndose diferencias significativas en los días 84 ($p=0,046$) y 98 ($p=0,027$) y muy significativas en la fase sintomática P91 ($p=0,007$).

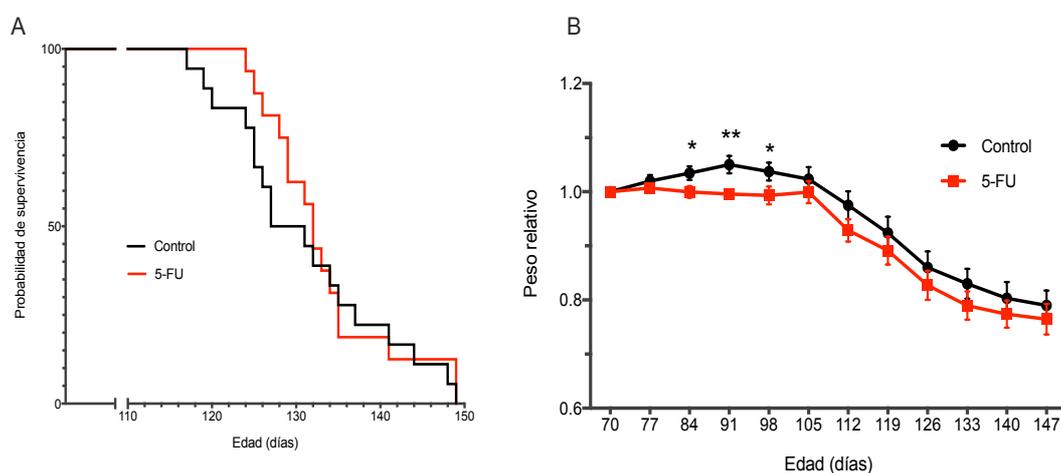


Figura 5.28. **Supervivencia y evolución del peso de ratones SOD1G93A tratados con 5-FU (150 mg/kg) procedentes de zona convencional.** (A) Supervivencia de animales tratados (línea roja) y sus controles (línea negra) ($133 \pm 1,9$ vs $131 \pm 2,3$ días; Mantel-Cox Log Rank $p=0,576$) (B) Evolución de peso de animales tratados (línea roja) y sus controles (línea negra). Los datos de peso corporal se expresan como media \pm SEM; t-student; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Si atendemos al efecto del fármaco en función del sexo (Figura 5.29), el 5-FU pareció mostrar algo más de efectividad en las hembras, aunque en ninguno de los casos se observó significación. En los machos (Figura 5.29A), el 5-FU prolongó 2 días la media de supervivencia ($130 \pm 1,2$ vs $128 \pm 1,7$ días; Mantel-Cox Log-Rank $p=0,725$). En las hembras (Figura 5.29B), aunque se observaron diferencias en los animales de muerte temprana, el 5-FU prolongó 3 días la longevidad de las hembras tratadas ($138 \pm 3,8$ vs $135 \pm 4,4$ días; Mantel-Cox Log-Rank $p=0,222$).

En cuanto a la evolución del peso de los machos (Figura 5.29C), el grupo tratado mostró mayor pérdida de peso tras 2 semanas de iniciar el tratamiento, y se mantuvo así durante el transcurso de la enfermedad, mostrando diferencias significativas entre grupos en la fase presintomática tardía P84 ($p=0,042$) hasta la fase sintomática P105 ($p=0,034$), llegando incluso a ser muy significativas a día 98 ($p=0,001$). En lo que respecta a las hembras (Figura 5.29D), la ganancia de peso fue similar en los dos grupos desde el día 105 (pico máximo de peso del grupo tratado); sin embargo, en las etapas iniciales de la enfermedad, el grupo tratado mostró menor ganancia de peso que el grupo control, aunque estas diferencias no resultaron significativas.

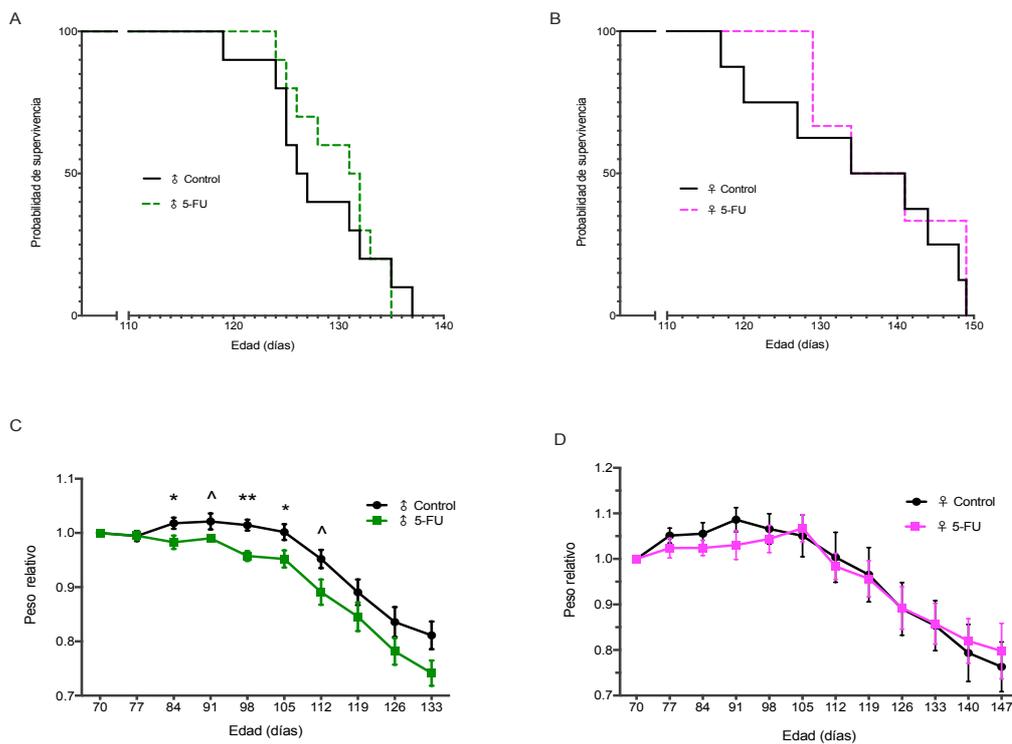


Figura 5.29. Supervivencia y evolución del peso de animales SOD1G93A tratados con 5-FU (150mg/kg) procedentes de zona convencional en función del sexo (A) Supervivencia de machos tratados con 5-FU (línea verde) y sus controles (línea negra) $130 \pm 1,2$ vs $128 \pm 1,7$ días; Mantel-Cox Log-Rank $p=0,725$) y (B) de hembras tratadas (línea rosa) y sus controles (línea negra) ($138 \pm 3,8$ vs $135 \pm 4,4$ días; Mantel-Cox Log-Rank $p=0,222$) (C) Evolución de peso corporal de machos tratados con 5-FU (línea verde) y sus controles (línea negra) y (D) de hembras tratadas (línea rosa) y sus controles (línea negra). Los datos de peso corporal se expresan como media \pm SEM; t-student; $\wedge p < 0,1$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

En resumen, se observaron diferencias en cuanto a la efectividad del 5-FU en los diferentes ambientes. Como queda reflejado en la Tabla 5.9, el 5-FU muestra efectividad en la nave 49 pero no en el resto de ambientes; sin embargo, en la zona convencional se observaron resultados más positivos que en los animales nacidos en la zona SPF (esterilidad total) aunque las diferencias no son significativas.

Tabla 5.9. Supervivencia de animales SOD1G93A tratados con 5-FU (150 mg/kg) procedentes de diferentes ambientes. Los datos se muestran como supervivencia media \pm SEM. Test Mantel-Cox Log Rank.

| | Nave 49 | Zona SPF | Zona Convencional |
|----------------|---------------|--------------------|-------------------|
| Control | 129 \pm 1,4 | 136,36 \pm 2,021 | 131,16 \pm 2,27 |
| 5-FU | 135 \pm 1,7 | 134,36 \pm 2,116 | 133,25 \pm 1,87 |
| | p=0,008 | p= 0,464 | p= 0,576 |

Nuestros resultados muestran como no se ha podido replicar el efecto terapéutico observado en el ensayo original, lo que sugiere que el 5-FU podría no mostrar efectividad en el modelo SOD1G93A en las dos zonas de mayor control ambiental. Ante estos resultados, nuestra hipótesis es que el ambiente en el que nacen y se desarrollan los animales tal vez tal vez pueda influir en la respuesta al tratamiento con el 5-FU, por ejemplo, por diferencias en el sistema inmunitario dependientes del ambiente en el que haya nacido y se desarrolle el animal.

La ELA tiene una manifestación heterogénea, por lo que incluso en casos en los que una mutación genética conocida sea causa de la enfermedad, solo podemos conocer y entender una pequeña parte de la patogénesis, no hay que olvidar que los factores epigenéticos y ambientales pueden jugar un papel crucial en la ELA.

Las características de los animalarios han cambiado en las últimas décadas, los ratones de laboratorio destinados a investigación básica y traslacional han pasado de estar alojados en instalaciones con unos controles ambientales y sanitarios menos restrictivos a instalaciones de barrera libres de patógenos específicos (SPF), esta terminología se utiliza para describir el estado microbiológico de las colonias de ratones que están libres de una lista definida de patógenos que incluyen virus, bacterias y parásitos endógenos (Dobson et al., 2019). Un gran inconveniente de este enfoque es que estas instalaciones anormalmente limpias no reflejan el entorno en el que se desarrolla el sistema inmunológico humano. Este ambiente de esterilidad y sus consecuencias en la fisiología y patobiología de los animales es un campo de investigación emergente. Un estudio reciente ha mostrado como la alteración del ambiente puede afectar profundamente a la composición celular del sistema inmunológico innato y adaptativo, dando como resultado cambios globales en los patrones de expresión de las células sanguíneas. El estudio mostró como ratones adultos SPF tenían sistemas inmunes inmaduros, cercanos a los de un recién nacido,

además de ser más propensos a la infección que los ratones provenientes de un entorno salvaje; asimismo, demostraron que el alojamiento compartido de animales SPF con ratones de tiendas de mascotas revirtió el problema y los ratones SPF mostraron sistemas inmunológicos más cercanos a los humanos adultos (Beura et al., 2016).

Por otra parte, en los últimos años ha crecido el interés por el papel del microbioma en el desarrollo de las patologías. Se ha demostrado como el ambiente influye en la microbiota intestinal, y como esta influye en la inflamación y respuesta inmunológica; de hecho, ratones SPF reconstituidos con microbiota natural exhiben una inflamación reducida y mayor supervivencia después de la infección por el virus de la influenza, además de mostrar una resistencia mejorada a la tumorigénesis colorrectal inducida (Rosshart et al., 2017). La microbiota intestinal juega un importante papel tanto en la salud como en las patologías, ya que participa en mecanismos fisiológicos tan importantes como metabolismo, respuesta al estrés, inflamación y respuesta inmunológica. Además, se ha relacionado la microbiota intestinal con enfermedades neurodegenerativas como Parkinson, Alzheimer (Scheperjans et al., 2015; Wang & Kasper, 2014) y ELA (Blacher et al., 2019; Wright et al., 2018).

Por otro lado, se ha estudiado como el microbioma puede influir en las respuestas quimioterápicas. Según estudios preclínicos, la administración de 5-FU conduce a una disbiosis intestinal y posterior inflamación (Hamouda et al., 2017; Sougiannis et al., 2019). Podría ser que esta disbiosis se agravara en animales SPF, ya que de por sí tienen una microbiota limitada, y esto pudiera producir un aumento de la neuroinflamación y desregulación del sistema inmune, de tal modo que el 5-FU no podría compensar o aliviar el daño producido.

Todos estos antecedentes sugieren que la experiencia microbiana influye profundamente en la función inmune y en el desarrollo de respuestas de novo (Masopust et al., 2017). Si los animales por nacer en determinados ambientes desarrollan un sistema inmunitario inmaduro o en niveles insuficientes, su competencia inmunológica puede no ser adecuada para hacer frente a una situación “anormal” como puede ser un proceso neurodegenerativo o a una respuesta adecuada a un tratamiento, como el 5-FU. Futuros estudios son necesarios para comprobar estas hipótesis.

Como se ha comentado en anteriores ocasiones, gran parte de los ensayos preclínicos fracasan en su traslación a la fase clínica. La reproducibilidad y replicabilidad son cruciales en todos los campos de la investigación experimental, pero más aún en la investigación con animales para asegurar la relevancia traslacional (Kafkafi et al., 2018). De los resultados

obtenidos en este capítulo podemos sacar varias reflexiones. Por una parte, cuando se demuestra la efectividad de una potencial terapia, debería realizarse el ensayo preclínico en otras localizaciones o laboratorios, e incluso en otros modelos animales para comprobar la reproducibilidad. Además, teniendo en cuenta las múltiples evidencias sobre la influencia del ambiente en los animales y por consiguiente en los resultados de los estudios, sería conveniente realizar los estudios preclínicos con animales provenientes de diferentes ambientes. Aumentar el rigor en los ensayos preclínicos tal vez aumente la probabilidad de éxito en la traslación a pacientes y esto evitaría muchos costes y sobre todo falsas esperanzas en los afectados de ELA.

CONCLUSIONES 6

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos a partir de las experiencias realizadas en el presente estudio, y de su discusión y contraste con otras aportaciones, podemos deducir las siguientes conclusiones:

- 1.- El tratamiento continuado con 5-FU en los animales modelos de ELA G93A reduce la neuroinflamación relacionada con NLRP3 en los últimos estadios de la enfermedad, en los tejidos más afectados por la enfermedad, músculo esquelético y médula espinal.
- 2.- El tratamiento continuado con 5-FU en los animales modelos de ELA G93A no muestra un efecto significativo sobre microRNAs relacionados con la neuroinflamación en ninguno de los tejidos más afectados por la enfermedad, músculo esquelético y médula espinal.
- 3.- La Capecitabina no mostró efectos adversos tras su aplicación en los modelos animales de ELA y respecto a la biodisponibilidad, el 5-FU es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica.
- 4.- No se observó un efecto beneficioso en los animales modelos de ELA G93A al disminuir o incrementar la dosis de 5-FU.
- 5.- Para proponer una posible terapia efectiva para pacientes de ELA con la utilización de los modelos animales de SOD1G93A es necesario como mínimo comprobar que dicho tratamiento se replica en distintas condiciones ambientales.

CONCLUSIONS

The results obtained from the experiments carried out in the present study, their discussion and contrast with other contributions prompted us to the following conclusions:

- 1.-Continued treatment with 5-FU in the ALS G93A model animals reduces the neuroinflammation related to NLRP3 in the last stages of the disease, in the tissues most affected by the disease, skeletal muscle and spinal cord.
- 2.- Continued treatment with 5-FU in ALS G93A model animals does not show a significant effect on neuroinflammation-related microRNAs in the tissues most affected by the disease, skeletal muscle and spinal cord.
- 3.- Capecitabine shows no adverse effects after its application in ALS animal models and, regarding bioavailability, 5-FU is able to cross the blood-brain barrier.
- 4.- No beneficial effect was observed in ALS G93A animal model by decreasing or increasing the dose of 5-FU.
- 5.- To propose a possible effective therapy for ALS patients using SOD1G93A animal models, it is necessary to at least verify that the treatment is replicated under various environmental conditions.

BIBLIOGRAFÍA 7

BIBLIOGRAFÍA

- Abe, K., Aoki, M., Tsuji, S., Itoyama, Y., Sobue, G., Togo, M., Hamada, C., Tanaka, M., Akimoto, M., Nakamura, K., Takahashi, F., Kondo, K., Yoshino, H., Abe, K., Aoki, M., Tsuji, S., Itoyama, Y., Sobue, G., Togo, M., ... Yoshino, H. (2017). Safety and efficacy of edaravone in well defined patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet Neurology*, *16*(7), 505-512. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30115-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30115-1)
- Abe, K., Itoyama, Y., Sobue, G., Tsuji, S., Aoki, M., Doyu, M., Hamada, C., Kondo, K., Yoneoka, T., Akimoto, M., Yoshino, H., & Group, E. A. L. S. S. (2014). Confirmatory double-blind, parallel-group, placebo-controlled study of efficacy and safety of edaravone (MCI-186) in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Amyotrophic Lateral Sclerosis & Frontotemporal Degeneration*, *15*(7-8), 610-617. <https://doi.org/10.3109/21678421.2014.959024>
- Advani, D., Gupta, R., Tripathi, R., Sharma, S., Ambasta, R. K., & Kumar, P. (2020). Protective role of anticancer drugs in neurodegenerative disorders: A drug repurposing approach. *Neurochemistry International*, *140*, 104841. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neuint.2020.104841>
- Aispuru G. R., Aquino-Esperanza J. A., Lettieri J. A., Miño C., Brandan N. C. (2006). Mielosupresión inducida por la quimioterapia con diferentes dosis de 5-fluorouracilo. Universidad Nacional del Nordeste Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2006.
- Aispuru G. R., Aquino -Esperanza J. A., Lettieri J. A., Aguirre M. V., Brandan N. C. (2006b). Efecto in vivo de diferentes dosis de 5-fluorouracilo sobre la cinética celular de médula ósea murina. Universidad Nacional del Nordeste Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2006
- Akamatsu, M., Yamashita, T., Hirose, N., Teramoto, S., & Kwak, S. (2016). The AMPA receptor antagonist perampanel robustly rescues amyotrophic lateral sclerosis (ALS) pathology in sporadic ALS model mice. *Scientific Reports*, *6*(1), 28649. <https://doi.org/10.1038/srep28649>
- Akinori Akaike, Yutaka Tamura, Yuko Sato, & Takeharu Yokota. (1993). Protective effects of a vitamin B12 analog, methylcobalamin, against glutamate cytotoxicity in cultured cortical neurons. *European Journal of Pharmacology*, *241*(1), 1-6. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0014-2999\(93\)90925-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0014-2999(93)90925-8)
- Al-Chalabi, A., & Hardiman, O. (2013). The epidemiology of ALS: A conspiracy of genes, environment and time. *Nature Reviews Neurology*, *9*(11), 617-628. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2013.203>
- Al-Chalabi, A., Shaw, P., Leigh, P. N., van den Berg, L., Hardiman, O., Ludolph, A., Aho, V. V., Sarapohja, T., & Kuoppamäki, M. (2019). Oral levosimendan in amyotrophic lateral sclerosis: a phase II multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, *90*(10), 1165 LP - 1170. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2018-320288>
- Al-Chalabi, A., Van Den Berg, L. H., & Veldink, J. (2017). Gene discovery in amyotrophic lateral sclerosis: Implications for clinical management. *Nature Reviews Neurology*, *13*(2), 96-104. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2016.182>

- Alberti, S., Mateju, D., Mediani, L., & Carra, S. (2017). Granulostasis: Protein Quality Control of RNP Granules En *Frontiers in Molecular Neuroscience* (Vol. 10, p. 84). <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00084>
- Alexander, G. M., Erwin, K. L., Byers, N., Deitch, J. S., Augelli, B. J., Blankenhorn, E. P., & Heiman-Patterson, T. D. (2004). Effect of transgene copy number on survival in the G93A SOD1 transgenic mouse model of ALS. *Molecular Brain Research*, 130(1), 7-15. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2004.07.002>
- Amlie-Wolf, A., Ryvkin, P., Tong, R., Dragomir, I., Suh, E., Xu, Y., Van Deerlin, V. M., Gregory, B. D., Kwong, L. K., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M. Y., Wang, L. S., & Lee, E. B. (2015). Transcriptomic changes due to cytoplasmic TDP-43 expression reveal dysregulation of histone transcripts and nuclear chromatin. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141836>
- Aquino J. A., Aispuru G. R., Lettieri C. N., Alvarez M, Brandan N. C., (2006). Efecto in vivo del 5-Fluorouracilo sobre Timo Murino. Universidad Nacional del Nordeste Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2006.
- Arthur, K. C., Calvo, A., Price, T. R., Geiger, J. T., Chiò, A., & Traynor, B. J. (2016). Projected increase in amyotrophic lateral sclerosis from 2015 to 2040. *Nature Communications*, 7, 1-6. <https://doi.org/10.1038/ncomms12408>
- Atassi, N., Berry, J., Shui, A., Zach, N., Sherman, A., Sinani, E., Walker, J., Katsovskiy, I., Schoenfeld, D., Cudkowicz, M., & Leitner, M. (2014). The PRO-ACT database. *Neurology*, 83(19), 1719 LP - 1725. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000951>
- Ayers, J. I., Fromholt, S. E., O'Neal, V. M., Diamond, J. H., & Borchelt, D. R. (2016). Prion-like propagation of mutant SOD1 misfolding and motor neuron disease spread along neuroanatomical pathways. *Acta Neuropathologica*. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1514-0>
- Babin, P. J., Goizet, C., & Raldúa, D. (2014). Zebrafish models of human motor neuron diseases: Advantages and limitations. *Progress in Neurobiology*, 118, 36-58. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2014.03.001>
- Balendra, R., & Isaacs, A. M. (2018). C9orf72-mediated ALS and FTD: multiple pathways to disease. *Nature Reviews Neurology*, 14(9), 544-558. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0047-2>
- Barber, S. C., & Shaw, P. J. (2010). Oxidative stress in ALS: Key role in motor neuron injury and therapeutic target. *Free Radical Biology and Medicine*, 48(5), 629-641. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.11.018>
- Barp, A., Gerardi, F., Lizio, A., Sansone, V. A., & Lunetta, C. (2020). Emerging Drugs for the Treatment of Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Focus on Recent Phase 2 Trials. *Expert Opinion on Emerging Drugs*, 25(2), 145-164. <https://doi.org/10.1080/14728214.2020.1769067>
- Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*, 136(2), 215-233. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002>

- Bastow, E. L., Peswani, A. R., Tarrant, D. S. J., Pentland, D. R., Chen, X., Morgan, A., Staniforth, G. L., Tullet, J. M., Rowe, M. L., Howard, M. J., Tuite, M. F., & Gourlay, C. W. (2016). New links between SOD1 and metabolic dysfunction from a yeast model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Cell Science*, 129(21), 4118 LP - 4129. <https://doi.org/10.1242/jcs.190298>
- Bauernfeind, F., Rieger, A., Schildberg, F. A., Knolle, P. A., Schmid-Burgk, J. L., & Hornung, V. (2012). NLRP3 Inflammasome Activity Is Negatively Controlled by miR-223. *The Journal of Immunology*, 189(8), 4175 LP - 4181. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201516>
- Bedlack, R. (2019). ALSUntangled 48: Perampanel (Fycompa). *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*, 20(5-6), 453-456. <https://doi.org/10.1080/21678421.2019.1573850>
- Beers, D. R., & Appel, S. H. (2019). Immune dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis: mechanisms and emerging therapies. *The Lancet Neurology*, 18(2), 211-220. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30394-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30394-6)
- Beers, D. R., Henkel, J. S., Zhao, W., Wang, J., Huang, A., Wen, S., Liao, B., & Appel, S. H. (2011). Endogenous regulatory T lymphocytes ameliorate amyotrophic lateral sclerosis in mice and correlate with disease progression in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*, 134(5), 1293-1314. <https://doi.org/10.1093/brain/awr074>
- Beers, D. R., Zhao, W., Wang, J., Zhang, X., Wen, S., Neal, D., Thonhoff, J. R., Alsuliman, A. S., Shpall, E. J., Rezvani, K., & Appel, S. H. (2017). ALS patients' regulatory T lymphocytes are dysfunctional, and correlate with disease progression rate and severity. *JCI Insight*, 2(5). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.89530>
- Bellezza, I., Grottelli, S., Costanzi, E., Scarpelli, P., Pigna, E., Morozzi, G., Mezzasoma, L., Peirce, M. J., Moresi, V., Adamo, S., & Minelli, A. (2018a). Peroxynitrite Activates the NLRP3 Inflammasome Cascade in SOD1(G93A) Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Molecular Neurobiology*, 55(3), 2350-2361. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0502-x>
- Bellezza, I., Grottelli, S., Costanzi, E., Scarpelli, P., Pigna, E., Morozzi, G., Mezzasoma, L., Peirce, M. J., Moresi, V., Adamo, S., & Minelli, A. (2018b). Peroxynitrite Activates the NLRP3 Inflammasome Cascade in SOD1(G93A) Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Molecular Neurobiology*, 55(3), 2350-2361. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0502-x>
- Belzil, V. V., Bauer, P. O., Gendron, T. F., Murray, M. E., Dickson, D., & Petrucelli, L. (2014). Characterization of DNA hypermethylation in the cerebellum of c9FTD/ALS patients. *Brain Research*, 1584, 15-21. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.02.015>
- Benatar, M., Wu, J., Andersen, P. M., Atassi, N., David, W., Cudkovic, M., & Schoenfeld, D. (2018). Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of arimoclomol in rapidly progressive SOD1 ALS. *Neurology*, 90(7), e565 LP-e574. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000004960>
- Bensimon, G., Lacomblez, L., & Meininger, V. (1994). A Controlled Trial of Riluzole in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *New England Journal of Medicine*, 330(9), 585-591. <https://doi.org/10.1056/NEJM199403033300901>
- Bergemalm, D., Forsberg, K., Srivastava, V., Graffmo, K. S., Andersen, P. M., Brännström, T., Wingsle, G., & Marklund, S. L. (2010). Superoxide dismutase-1 and other proteins in inclusions from transgenic amyotrophic lateral sclerosis model mice. *Journal of*

Neurochemistry, 114(2), 408-418. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06753.x>

- Berry, J. D., Paganoni, S., Atassi, N., Macklin, E. A., Goyal, N., Rivner, M., Simpson, E., Appel, S., Grasso, D. L., Mejia, N. I., Mateen, F., Gill, A., Vieira, F., Tassinari, V., & Perrin, S. (2017). Phase IIa trial of fingolimod for amyotrophic lateral sclerosis demonstrates acceptable acute safety and tolerability. *Muscle & Nerve*, 56(6), 1077-1084. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/mus.25733>
- Berthod, F., & Gros-Louis, F. (2012). In Vivo and In Vitro Models to Study Amyotrophic Lateral Sclerosis. En *Amyotrophic Lateral Sclerosis*. <https://doi.org/10.5772/39076>
- Beura, L. K., Hamilton, S. E., Bi, K., Schenkel, J. M., Odumade, O. A., Casey, K. A., Thompson, E. A., Fraser, K. A., Rosato, P. C., Filali-Mouhim, A., Sekaly, R. P., Jenkins, M. K., Vezys, V., Haining, W. N., Jameson, S. C., & Masopust, D. (2016). Normalizing the environment recapitulates adult human immune traits in laboratory mice. *Nature*, 532(7600), 512-516. <https://doi.org/10.1038/nature17655>
- Bilsland, L. G., Sahai, E., Kelly, G., Golding, M., Greensmith, L., & Schiavo, G. (2010). Deficits in axonal transport precede ALS symptoms in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(47), 20523 LP - 20528. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006869107>
- Blacher, E., Bashiardes, S., Shapiro, H., Rothschild, D., Mor, U., Dori-Bachash, M., Kleimeyer, C., Moresi, C., Harnik, Y., Zur, M., Zabari, M., Brik, R. B.-Z., Kviatcovsky, D., Zmora, N., Cohen, Y., Bar, N., Levi, I., Amar, N., Mehlman, T., ... Elinav, E. (2019). Potential roles of gut microbiome and metabolites in modulating ALS in mice. *Nature*, 572(7770), 474-480. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1443-5>
- Blokhuis, A. M., Groen, E. J. N., Koppers, M., van den Berg, L. H., & Pasterkamp, R. J. (2013). Protein aggregation in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathologica*, 125(6), 777-794. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1125-6>
- Borja-Gonzalez, M., Casas-Martinez, J., McDonagh, B., & Goljanek-Whysall, K. (2020). InflammamiR-21 Negatively Regulates Myogenesis during Ageing. *Antioxidants*, 9, 345. <https://doi.org/10.3390/antiox9040345>
- Boursereau, R., Abou-Samra, M., Lecompte, S., Noel, L., & Brichard, S. M. (2018). Downregulation of the NLRP3 inflammasome by adiponectin rescues Duchenne muscular dystrophy. *BMC Biology*, 16(1), 33. <https://doi.org/10.1186/s12915-018-0501-z>
- Brooks, B. R., Miller, R. G., Swash, M., & Munsat, T. L. (2000). El Escorial revisited: Revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Motor Neuron Disorders*, 1(5), 293-299. <https://doi.org/10.1080/146608200300079536>
- Burk, K., & Pasterkamp, R. J. (2019). Disrupted neuronal trafficking in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathologica*, 137(6), 859-877. <https://doi.org/10.1007/s00401-019-01964-7>
- Butovsky, O., Jedrychowski, M. P., Cialic, R., Krasemann, S., Murugaiyan, G., Fanek, Z., Greco, D. J., Wu, P. M., Doykan, C. E., Kiner, O., Lawson, R. J., Frosch, M. P., Pochet, N., El Fatimy, R., Krichevsky, A. M., Gygi, S. P., Lassmann, H., Berry, J., Cudkowicz, M. E., & Weiner, H. L. (2015). Targeting miR-155 restores abnormal microglia and attenuates disease in SOD1 mice. *Annals of Neurology*, 77(1), 75-99. <https://doi.org/10.1002/ana.24304>

- Butovsky, O., Siddiqui, S., Gabriely, G., Lanser, A. J., Dake, B., Murugaiyan, G., Doykan, C. E., Wu, P. M., Gali, R. R., Iyer, L. K., Lawson, R., Berry, J., Krichevsky, A. M., Cudkowicz, M. E., & Weiner, H. L. (2012). Modulating inflammatory monocytes with a unique microRNA gene signature ameliorates murine ALS. *The Journal of Clinical Investigation*, *122*(9), 3063-3087. <https://doi.org/10.1172/JCI62636>
- Butti, Z., & Patten, S. A. (2019). RNA dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis. En *Frontiers in Genetics*. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00712>
- Calvo, A. C., Moreno-Igoa, M., Mancuso, R., Manzano, R., Oliván, S., Muñoz, M. J., Penas, C., Zaragoza, P., Navarro, X., & Osta, R. (2011). Lack of a synergistic effect of a non-viral ALS gene therapy based on BDNF and a TTC fusion molecule. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, *6*(1), 10. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-6-10>
- Calvo, A. C., Moreno-Igoa, M., Manzano, R., Ordovás, L., Yagüe, G., Oliván, S., Muñoz, M. J., Zaragoza, P., & Osta, R. (2008). Determination of protein and RNA expression levels of common housekeeping genes in a mouse model of neurodegeneration. *PROTEOMICS*, *8*(20), 4338-4343. <https://doi.org/10.1002/pmic.200701091>
- Campanari, M. L., Bourefis, A. R., & Kabashi, E. (2019). Diagnostic challenge and neuromuscular junction contribution to ALS pathogenesis. En *Frontiers in Neurology*. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00068>
- Campos-Melo, D., Droppelmann, C. A., He, Z., Volkening, K., & Strong, M. J. (2013). Altered microRNA expression profile in amyotrophic lateral sclerosis: a role in the regulation of NFL mRNA levels. *Molecular Brain*, *6*(1), 26. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-6-26>
- Carrì, M. T., Valle, C., Bozzo, F., & Cozzolino, M. (2015). Oxidative stress and mitochondrial damage: Importance in non-SOD1 ALS. En *Frontiers in Cellular Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00041>
- Cassidy, J., Twelves, C., Van Cutsem, E., Hoff, P., Bajetta, E., Boyer, M., Bugat, R., Burger, U., Garin, A., Graeven, U., McKendric, J., Maroun, J., Marshall, J., Osterwalder, B., Pérez-Manga, G., Rosso, R., Rougier, P., Schilsky, R. L., & Capecitabine Colorectal Cancer Study Group. (2002). First-line oral capecitabine therapy in metastatic colorectal cancer: a favorable safety profile compared with intravenous 5-fluorouracil/leucovorin. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, *13*(4), 566—575. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdf089>
- Chang, H.-Y., Hou, S.-C., Way, T.-D., Wong, C.-H., & Wang, I.-F. (2013). Heat-shock protein dysregulation is associated with functional and pathological TDP-43 aggregation. *Nature Communications*, *4*(1), 2757. <https://doi.org/10.1038/ncomms3757>
- Chang, L., Niu, F., Chen, J., Cao, X., Liu, Z., Bao, X., & Xu, Y. (2019). Ghrelin improves muscle function in dystrophin-deficient mdx mice by inhibiting NLRP3 inflammasome activation. *Life Sciences*, *232*, 116654. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116654>
- Chang, Y., Kong, Q., Shan, X., Tian, G., Ilieva, H., Cleveland, D. W., Rothstein, J. D., Borchelt, D. R., Wong, P. C., & Lin, C. L. G. (2008). Messenger RNA oxidation occurs early in disease pathogenesis and promotes motor neuron degeneration in ALS. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002849>

- Chen, J. F., Tao, Y., Li, J., Deng, Z., Yan, Z., Xiao, X., & Wang, D. Z. (2010). microRNA-1 and microRNA-206 regulate skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by repressing Pax7. *Journal of Cell Biology*. <https://doi.org/10.1083/jcb.200911036>
- Chen, P.-C., Hsieh, Y.-C., Huang, C.-C., & Hu, C.-J. (2020). Tamoxifen for amyotrophic lateral sclerosis: A randomized double-blind clinical trial. *Medicine*, *99*(22). doi: 10.1097/MD.00000000000020423.
- Chew, J., Gendron, T. F., Prudencio, M., Sasaguri, H., Zhang, Y.-J., Castanedes-Casey, M., Lee, C. W., Jansen-West, K., Kurti, A., Murray, M. E., Bieniek, K. F., Bauer, P. O., Whitelaw, E. C., Rousseau, L., Stankowski, J. N., Stetler, C., Daugherty, L. M., Perkerson, E. A., Desaro, P., ... Petrucelli, L. (2015). &em>C9ORF72 repeat expansions in mice cause TDP-43 pathology, neuronal loss, and behavioral deficits. *Science*, *348*(6239), 1151 LP - 1154. <https://doi.org/10.1126/science.aaa9344>
- Chiò, A., Mazzini, L., & Mora, G. (2020). Disease-modifying therapies in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropharmacology*, *167*, 107986. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.107986>
- Cho, Y., Crichlow, G. V., Vermeire, J. J., Leng, L., Du, X., Hodsdon, M. E., Bucala, R., Cappello, M., Gross, M., Gaeta, F., Johnson, K., & Lolis, E. J. (2010). Allosteric inhibition of macrophage migration inhibitory factor revealed by ibudilast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(25), 11313 LP - 11318. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002716107>
- Ciriza, J., Moreno-Igoa, M., Calvo, A. C., Yague, G., Palacio, J., Miana-Mena, F. J., Muñoz, M. J., Zaragoza, P., Brûlet, P., & Pinzolas, R. Y. O. (2008). A genetic fusion GDNF-C fragment of tetanus toxin prolongs survival in a symptomatic mouse ALS model. *Restorative Neurology and Neuroscience*.
- Clement, A. M., Nguyen, M. D., Roberts, E. A., Garcia, M. L., Boillée, S., Rule, M., McMahon, A. P., Doucette, W., Siwek, D., Ferrante, R. J., Brown, R. H., Julien, J.-P., Goldstein, L. S. B., & Cleveland, D. W. (2003). Wild-Type Nonneuronal Cells Extend Survival of SOD1 Mutant Motor Neurons in ALS Mice. *Science*, *302*(5642), 113 LP - 117. <https://doi.org/10.1126/science.1086071>
- Collibee, S. E., Bergnes, G., Muci, A., Browne, W. F., Garard, M., Hinken, A. C., Russell, A. J., Suehiro, I., Hartman, J., Kawas, R., Lu, P.-P., Lee, K. H., Marquez, D., Tomlinson, M., Xu, D., Kennedy, A., Hwee, D., Schaletzky, J., Leung, K., ... Morgan, B. P. (2018). Discovery of Tirasemtiv, the First Direct Fast Skeletal Muscle Troponin Activator. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, *9*(4), 354-358. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.7b00546>
- Cooper-Knock, J., Walsh, M. J., Higginbottom, A., Robin Highley, J., Dickman, M. J., Edbauer, D., Ince, P. G., Wharton, S. B., Wilson, S. A., Kirby, J., Hautbergue, G. M., & Shaw, P. J. (2014). Sequestration of multiple RNA recognition motif-containing proteins by C9orf72 repeat expansions. *Brain*, *137*(7), 2040-2051. <https://doi.org/10.1093/brain/awu120>
- Coughlan, K. S., Halang, L., Woods, I., & Prehn, J. H. M. (2016). A high-fat jelly diet restores bioenergetic balance and extends lifespan in the presence of motor dysfunction and lumbar spinal cord motor neuron loss in TDP-43<sup>A315T</sup> mutant C57BL6/J mice. *Disease Models & Mechanisms*, *9*(9), 1029 LP - 1037. <https://doi.org/10.1242/dmm.024786>
- Cozzolino, M., & Carrì, M. T. (2012). Mitochondrial dysfunction in ALS. *Progress in Neurobiology*, *97*(2), 54-66. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.06.003>

- Cozzolino, M., Ferri, A., Valle, C., & Carrì, M. T. (2013). Mitochondria and ALS: Implications from novel genes and pathways. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *55*, 44-49. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mcn.2012.06.001>
- Cristofani, R., Rusmini, P., Galbiati, M., Cicardi, M. E., Ferrari, V., Tedesco, B., Casarotto, E., Chierichetti, M., Messi, E., Piccolella, M., Carra, S., Crippa, V., & Poletti, A. (2019). The Regulation of the Small Heat Shock Protein B8 in Misfolding Protein Diseases Causing Motoneuronal and Muscle Cell Death . En *Frontiers in Neuroscience* (Vol. 13, p. 796). <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00796>
- Crotty, G. F., Ascherio, A., & Schwarzschild, M. A. (2017). Targeting urate to reduce oxidative stress in Parkinson disease. *Experimental Neurology*, *298*, 210-224. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.06.017>
- Cudkovicz, M. E., van den Berg, L. H., Shefner, J. M., Mitsumoto, H., Mora, J. S., Ludolph, A., Hardiman, O., Bozik, M. E., Ingersoll, E. W., Archibald, D., Meyers, A. L., Dong, Y., Farwell, W. R., & Kerr, D. A. (2013). Dexamipexole versus placebo for patients with amyotrophic lateral sclerosis (EMPOWER): a randomised, double-blind, phase 3 trial. *The Lancet Neurology*, *12*(11), 1059-1067. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70221-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70221-7)
- De Felice, B., Guida, M., Guida, M., Coppola, C., De Mieri, G., & Cotrufo, R. (2012). A miRNA signature in leukocytes from sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Gene*, *508*(1), 35-40. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.07.058>
- De Giorgio, F., Maduro, C., Fisher, E. M. C., & Acevedo-Arozena, A. (2019). Transgenic and physiological mouse models give insights into different aspects of amyotrophic lateral sclerosis. En *DMM Disease Models and Mechanisms*. <https://doi.org/10.1242/dmm.037424>
- de Munter, J., Babaevskaya, D., Wolters, E. C., Pavlov, D., Lysikova, E., V. Kalueff, A., Gorlova, A., Oplatchikova, M., Pomytkin, I. A., Proshin, A., Umriukhin, A., Lesch, K.-P., & Strekalova, T. (2020). Molecular and behavioural abnormalities in the FUS-tg mice mimic frontotemporal lobar degeneration: Effects of old and new anti-inflammatory therapies. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *24*(17), 10251-10257. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jcmm.15628>
- De Paola, E., Verdile, V., & Paronetto, M. P. (2019). Dysregulation of microRNA metabolism in motor neuron diseases: Novel biomarkers and potential therapeutics. *Non-coding RNA Research*, *4*(1), 15-22. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ncrna.2018.12.001>
- De Vos, K. J., Chapman, A. L., Tennant, M. E., Manser, C., Tudor, E. L., Lau, K.-F., Brownlees, J., Ackerley, S., Shaw, P. J., McLoughlin, D. M., Shaw, C. E., Leigh, P. N., Miller, C. C. J., & Grierson, A. J. (2007). Familial amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutants perturb fast axonal transport to reduce axonal mitochondria content. *Human Molecular Genetics*, *16*(22), 2720-2728. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm226>
- Debye, B., Schmölling, L., Zhou, L., Rune, G., Beyer, C., & Johann, S. (2018). Neurodegeneration and NLRP3 inflammasome expression in the anterior thalamus of SOD1(G93A) ALS mice. *Brain Pathology*, *28*(1), 14-27. <https://doi.org/10.1111/bpa.12467>
- Degterev, A., Ofengeim, D., & Yuan, J. (2019). Targeting RIPK1 for the treatment of human diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *116*(20), 9714 LP - 9722. <https://doi.org/10.1073/pnas.1901179116>

- DeJesus-Hernandez, M., Mackenzie, I. R., Boeve, B. F., Boxer, A. L., Baker, M., Rutherford, N. J., Nicholson, A. M., Finch, N. C. A., Flynn, H., Adamson, J., Kouri, N., Wojtas, A., Sengdy, P., Hsiung, G. Y. R., Karydas, A., Seeley, W. W., Josephs, K. A., Coppola, G., Geschwind, D. H., ... Fang, F. (2011). Amyotrophic Lateral Sclerosis: An Update for 2018. *Nature Reviews Neurology*. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2013.203>
- Deora, V., Lee, J. D., Albornoz, E. A., McAlary, L., Jagaraj, C. J., Robertson, A. A. B., Atkin, J. D., Cooper, M. A., Schroder, K., Yerbury, J. J., Gordon, R., & Woodruff, T. M. (2020). The microglial NLRP3 inflammasome is activated by amyotrophic lateral sclerosis proteins. *GLIA*. <https://doi.org/10.1002/glia.23728>
- Desmoulin, F., Gilard, V., Malet-Martino, M., & Martino, R. (2002). Metabolism of capecitabine, an oral fluorouracil prodrug: (19)F NMR studies in animal models and human urine. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 30 11, 1221-1229.
- Dharmadasa, T., & Kiernan, M. C. (2018). Riluzole, disease stage and survival in ALS. *The Lancet Neurology*, 17(5), 385-386. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30091-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30091-7)
- Di Gregorio, S. E., & Duennwald, M. L. (2018). ALS Yeast Models-Past Success Stories and New Opportunities. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11, 394. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00394>
- Dietrich, J., Han, R., Yang, Y., Mayer-Pröschel, M., & Noble, M. (2006). CNS progenitor cells and oligodendrocytes are targets of chemotherapeutic agents in vitro and in vivo. *Journal of Biology*. <https://doi.org/10.1186/jbiol50>
- Dobrowolny, G., Aucello, M., Rizzuto, E., Beccafico, S., Mammucari, C., Boncompagni, S., Belia, S., Wannenes, F., Nicoletti, C., Del Prete, Z., Rosenthal, N., Molinaro, M., Protasi, F., Fanò, G., Sandri, M., & Musarò, A. (2008). Skeletal Muscle Is a Primary Target of SOD1^{G93A}-Mediated Toxicity. *Cell Metabolism*, 8(5), 425-436. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.09.002>
- Dobson, G., Letson, H., Biros, E., & Morris, J. (2019). Specific pathogen-free (SPF) animal status as a variable in biomedical research: Have we come full circle? *EBioMedicine*, 41. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.02.038>
- Dubois, M., Lapinte, N., Villier, V., Lecointre, C., Roy, V., Tonon, M. C., Gandolfo, P., Joly, F., Hilber, P., & Castel, H. (2014). Chemotherapy-induced long-term alteration of executive functions and hippocampal cell proliferation: Role of glucose as adjuvant. *Neuropharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.11.012>
- Eisen, A., & Weber, M. (2001). The motor cortex and amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle & Nerve*, 24(4), 564-573. <https://doi.org/10.1002/mus.1042>
- ELBeltagy, M., Mustafa, S., Umka, J., Lyons, L., Salman, A., Dormon, K., Allcock, C., Bennett, G., & Wigmore, P. (2012). The effect of 5-fluorouracil on the long term survival and proliferation of cells in the rat hippocampus. *Brain Research Bulletin*. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2012.05.005>
- Elden, A. C., Kim, H.-J., Hart, M. P., Chen-Plotkin, A. S., Johnson, B. S., Fang, X., Armarkola, M., Geser, F., Greene, R., Lu, M. M., Padmanabhan, A., Clay-Falcone, D., McCluskey, L., Elman, L., Juhr, D., Gruber, P. J., Rüb, U., Auburger, G., Trojanowski, J. Q., ... Gitler, A. D. (2010). Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS. *Nature*, 466(7310), 1069-1075. <https://doi.org/10.1038/nature09320>

- Endo, F., Komine, O., Fujimori-Tonou, N., Katsuno, M., Jin, S., Watanabe, S., Sobue, G., Dezawa, M., Wyss-Coray, T., & Yamanaka, K. (2015). Astrocyte-Derived TGF- β 1 Accelerates Disease Progression in ALS Mice by Interfering with the Neuroprotective Functions of Microglia and T Cells. *Cell Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.03.053>
- Erschbamer, M., Pernold, K., & Olson, L. (2007). Inhibiting epidermal growth factor receptor improves structural, locomotor, sensory, and bladder recovery from experimental spinal cord injury. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1037-07.2007>
- Esperanza, G. R. A., José, A., Bioquímica, C. De, Medicina, F. De, & Nacional, U. (2006). *Efecto in vivo de diferentes dosis de 5-fluorouracilo sobre la cinética celular de médula ósea murina*. 10-13.
- Fang, T., Al Khleifat, A., Meurgey, J.-H., Jones, A., Leigh, P. N., Bensimon, G., & Al-Chalabi, A. (2018). Stage at which riluzole treatment prolongs survival in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a retrospective analysis of data from a dose-ranging study. *The Lancet Neurology*, 17(5), 416-422. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30054-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30054-1)
- Farg, M. A., Sundaramoorthy, V., Sultana, J. M., Yang, S., Atkinson, R. A. K., Levina, V., Halloran, M. A., Gleeson, P. A., Blair, I. P., Soo, K. Y., King, A. E., & Atkin, J. D. (2014). C9ORF72, implicated in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia, regulates endosomal trafficking. *Human Molecular Genetics*, 23(13), 3579-3595. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu068>
- Ferraiuolo, L., Kirby, J., Grierson, A. J., Sendtner, M., & Shaw, P. J. (2011). Molecular pathways of motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. En *Nature Reviews Neurology*. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2011.152>
- Fiala, M., Mizwicki, M. T., Weitzman, R., Magpantay, L., & Nishimoto, N. (2013). Tocilizumab infusion therapy normalizes inflammation in sporadic ALS patients. *American Journal of Neurodegenerative Diseases*.
- Figuroa-Romero, C., Hur, J., Lunn, J. S., Paez-Colasante, X., Bender, D. E., Yung, R., Sakowski, S. A., & Feldman, E. L. (2016). Expression of microRNAs in human post-mortem amyotrophic lateral sclerosis spinal cords provides insight into disease mechanisms. *Molecular and Cellular Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2015.12.008>
- Fischer, L. R., Culver, D. G., Tennant, P., Davis, A. A., Wang, M., Castellano-Sanchez, A., Khan, J., Polak, M. A., & Glass, J. D. (2004). Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Experimental Neurology*, 185(2), 232-240. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2003.10.004>
- Fischer, L. R., Li, Y., Asress, S. A., Jones, D. P., & Glass, J. D. (2012). Absence of SOD1 leads to oxidative stress in peripheral nerve and causes a progressive distal motor axonopathy. *Experimental Neurology*. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.09.020>
- Freischmidt, A., Müller, K., Zondler, L., Weydt, P., Volk, A. E., Božič, A. L., Walter, M., Bonin, M., Mayer, B., von Arnim, C. A. F., Otto, M., Dieterich, C., Holzmann, K., Andersen, P. M., Ludolph, A. C., Danzer, K. M., & Weishaupt, J. H. (2014). Serum microRNAs in patients with genetic amyotrophic lateral sclerosis and pre-manifest mutation carriers. *Brain*, 137(11), 2938-2950. <https://doi.org/10.1093/brain/awu249>

- Garbuzova-Davis, S., & Sanberg, P. R. (2014). Blood-CNS barrier impairment in ALS patients versus an animal model. En *Frontiers in Cellular Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00021>
- Garbuzova-Davis, S., Saporta, S., Haller, E., Kolomey, I., Bennett, S. P., Potter, H., & Sanberg, P. R. (2007). Evidence of Compromised Blood-Spinal Cord Barrier in Early and Late Symptomatic SOD1 Mice Modeling ALS. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001205>
- Gasco, S., Zaragoza, P., García-Redondo, A., Calvo, A. C., & Osta, R. (2017). Inflammatory and non-inflammatory monocytes as novel prognostic biomarkers of survival in SOD1G93A mouse model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PLOS ONE*, *12*(9), e0184626. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184626>
- Gaudet, A. D., Fonken, L. K., Watkins, L. R., Nelson, R. J., & Popovich, P. G. (2017). MicroRNAs: Roles in Regulating Neuroinflammation. *The Neuroscientist*, *24*(3), 221-245. <https://doi.org/10.1177/1073858417721150>
- Geevasinga, N., Menon, P., Özdinler, P. H., Kiernan, M. C., & Vucic, S. (2016). Pathophysiological and diagnostic implications of cortical dysfunction in ALS. *Nature reviews. Neurology*, *12*(11), 651–661. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2016.140>
- Geloso, M. C., Corvino, V., Marchese, E., Serrano, A., Michetti, F., & D'Ambrosi, N. (2017). The Dual Role of Microglia in ALS: Mechanisms and Therapeutic Approaches . En *Frontiers in Aging Neuroscience* (Vol. 9, p. 242). <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00242>
- Gitler, A. D., & Tsuiji, H. (2016). There has been an awakening: Emerging mechanisms of C9orf72 mutations in FTD/ALS. *Brain Research*, *1647*, 19-29. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.04.004>
- Goffeau, A., Barrell, G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., & Oliver, S. G. (1996). Life with 6000 genes. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.274.5287.546>
- Golko-Perez, S., Amit, T., Youdim, M. B. H., & Weinreb, O. (2016). Beneficial Effects of Multitarget Iron Chelator on Central Nervous System and Gastrocnemius Muscle in SOD1G93A Transgenic ALS Mice. *Journal of Molecular Neuroscience*, *59*(4), 504-510. <https://doi.org/10.1007/s12031-016-0763-2>
- Gordon, R., Albornoz, E. A., Christie, D. C., Langley, M. R., Kumar, V., Mantovani, S., Robertson, A. A. B., Butler, M. S., Rowe, D. B., O'Neill, L. A., Kanthasamy, A. G., Schroder, K., Cooper, M. A., & Woodruff, T. M. (2018). Inflammasome inhibition prevents α -synuclein pathology and dopaminergic neurodegeneration in mice. *Science Translational Medicine*, *10*(465), eaah4066. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aah4066>
- Gouel, F., Rolland, A.-S., Devedjian, J.-C., Burnouf, T., & Devos, D. (2019). Past and Future of Neurotrophic Growth Factors Therapies in ALS: From Single Neurotrophic Growth Factor to Stem Cells and Human Platelet Lysates . En *Frontiers in Neurology* (Vol. 10, p. 835). <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00835>
- Grad, L. I., Guest, W. C., Yanai, A., Pokrishevsky, E., O'Neill, M. A., Gibbs, E., Semenchenko, V., Yousefi, M., Wishart, D. S., Plotkin, S. S., & Cashman, N. R. (2011). Intermolecular transmission of superoxide dismutase 1 misfolding in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(39), 16398 LP - 16403.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1102645108>

- Greenbaum, D., Colangelo, C., Williams, K., & Gerstein, M. (2003). Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome Biology*, 4(9), 117. <https://doi.org/10.1186/gb-2003-4-9-117>
- Grem, J. L. (1997). Mechanisms of Action and modulation of fluorouracil. *Seminars in Radiation Oncology*, 7(4), 249-259. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1053-4296\(97\)80023-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1053-4296(97)80023-9)
- Guan, Y., & Han, F. (2020). Key Mechanisms and Potential Targets of the NLRP3 Inflammasome in Neurodegenerative Diseases . En *Frontiers in Integrative Neuroscience* (Vol. 14, p. 37). <https://doi.org/10.3389/fnint.2020.00037>
- Gugliandolo, A., Giacoppo, S., Bramanti, P., & Mazzon, E. (2018). NLRP3 Inflammasome Activation in a Transgenic Amyotrophic Lateral Sclerosis Model. *Inflammation*, 41(1), 93-103. <https://doi.org/10.1007/s10753-017-0667-5>
- Guo, W., Fumagalli, L., Prior, R., & Van Den Bosch, L. (2017). Current Advances and Limitations in Modeling ALS/FTD in a Dish Using Induced Pluripotent Stem Cells . En *Frontiers in Neuroscience* (Vol. 11, p. 671). <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00671>
- Gurney, M. E., Pu, H., Chiu, A. Y., Dal Canto, M. C., Polchow, C. Y., Alexander, D. D., Caliendo, J., Hentati, A., Kwon, Y. W., Deng, H. X., & et. al. (1994). Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science*, 264(5166), 1772 LP - 1775. <https://doi.org/10.1126/science.8209258>
- Haeusler, A. R., Donnelly, C. J., Periz, G., Simko, E. A. J., Shaw, P. G., Kim, M.-S., Maragakis, N. J., Troncoso, J. C., Pandey, A., Sattler, R., Rothstein, J. D., & Wang, J. (2014). C9orf72 nucleotide repeat structures initiate molecular cascades of disease. *Nature*, 507(7491), 195-200. <https://doi.org/10.1038/nature13124>
- Haeusler, A. R., Donnelly, C. J., & Rothstein, J. D. (2016). The expanding biology of the C9orf72 nucleotide repeat expansion in neurodegenerative disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 17(6), 383-395. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.38>
- Haidet-Phillips, A. M., Hester, M. E., Miranda, C. J., Meyer, K., Braun, L., Frakes, A., Song, S., Likhite, S., Murtha, M. J., Foust, K. D., Rao, M., Eagle, A., Kammesheidt, A., Christensen, A., Mendell, J. R., Burghes, A. H. M., & Kaspar, B. K. (2011). Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons. *Nature Biotechnology*, 29(9), 824-828. <https://doi.org/10.1038/nbt.1957>
- Hamouda, N., Sano, T., Oikawa, Y., Ozaki, T., Shimakawa, M., Matsumoto, K., Amagase, K., Higuchi, K., & Kato, S. (2017). Apoptosis, Dysbiosis and Expression of Inflammatory Cytokines are Sequential Events in the Development of 5-Fluorouracil-Induced Intestinal Mucositis in Mice. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 121. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12793>
- Han, R., Yang, Y. M., Dietrich, J., Luebke, A., Mayer-Pröschel, M., & Noble, M. (2008). Systemic 5-fluorouracil treatment causes a syndrome of delayed myelin destruction in the central nervous system. *Journal of Biology*, 7(4), 12. <https://doi.org/10.1186/jbiol69>
- Hardiman, O., Al-Chalabi, A., Chio, A., Corr, E. M., Logroscino, G., Robberecht, W., Shaw, P. J., Simmons, Z., & van den Berg, L. H. (2017). Amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1), 17071. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.71>

- Hatzipetros, T., Bogdanik, L. P., Tassinari, V. R., Kidd, J. D., Moreno, A. J., Davis, C., Osborne, M., Austin, A., Vieira, F. G., Lutz, C., & Perrin, S. (2014). C57BL/6J congenic Prp-TDP43A315T mice develop progressive neurodegeneration in the myenteric plexus of the colon without exhibiting key features of ALS. *Brain Research*, *1584*, 59-72. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.10.013>
- Hawrot, J., Imhof, S., & Wainger, B. J. (2020). Modeling cell-autonomous motor neuron phenotypes in ALS using iPSCs. *Neurobiology of Disease*, *134*, 104680. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104680>
- Heidelberger, C., Chaudhuri, N., Danneberg, P., Mooren, D., Griesbach, L., Duschinsky, R., Schnitzer, R., Plevin, E., & Scheiner, J. (1957). Fluorinated Pyrimidines, A New Class of Tumour-Inhibitory Compounds. *Nature*, *179*, 663-666.
- Heneka, M. T., Kummer, M. P., Stutz, A., Delekate, A., Schwartz, S., Vieira-Saecker, A., Griep, A., Axt, D., Remus, A., Tzeng, T.-C., Gelpi, E., Halle, A., Korte, M., Latz, E., & Golenbock, D. T. (2013). NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature*, *493*(7434), 674-678. <https://doi.org/10.1038/nature11729>
- Henkel, J. S., Beers, D. R., Wen, S., Rivera, A. L., Toennis, K. M., Appel, J. E., Zhao, W., Moore, D. H., Powell, S. Z., & Appel, S. H. (2013). Regulatory T-lymphocytes mediate amyotrophic lateral sclerosis progression and survival. *EMBO Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.1002/emmm.201201544>
- Henriques, A., Pitzer, C., & Schneider, A. (2010). Neurotrophic growth factors for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis: where do we stand? . En *Frontiers in Neuroscience* (Vol. 4, p. 32). DOI: 10.3389/fnins.2010.00032
- Herdewyn, S., Cirillo, C., Van Den Bosch, L., Robberecht, W., Vanden Berghe, P., & Van Damme, P. (2014). Prevention of intestinal obstruction reveals progressive neurodegeneration in mutant TDP-43 (A315T)mice. *Molecular Neurodegeneration*, *9*(1), 24. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-9-24>
- Hewitt, C., Kirby, J., Highley, J. R., Hartley, J. A., Hibberd, R., Hollinger, H. C., Williams, T. L., Ince, P. G., McDermott, C. J., & Shaw, P. J. (2010). Novel FUS/TLS mutations and pathology in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Archives of neurology*, *67*(4), 455—461. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2010.52>
- Higgins, C. M. J., Jung, C., & Xu, Z. (2003). ALS-associated mutant SOD1G93A causes mitochondrial vacuolation by expansion of the intermembrane space and by involvement of SOD1 aggregation and peroxisomes. *BMC Neuroscience*, *4*(1), 16. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-4-16>
- Hill, S. J., Mordes, D. A., Cameron, L. A., Neuberger, D. S., Landini, S., Eggan, K., & Livingston, D. M. (2016). Two familial ALS proteins function in prevention/repair of transcription-associated DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(48), E7701 LP-E7709. <https://doi.org/10.1073/pnas.1611673113>
- Hooten, K. G., Beers, D. R., Zhao, W., & Appel, S. H. (2015). Protective and Toxic Neuroinflammation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotherapeutics*, *12*(2), 364-375. <https://doi.org/10.1007/s13311-014-0329-3>
- Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J. E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., McLaren, S., Sealy, I., Caccamo, M., Churcher, C.,

- Scott, C., Barrett, J. C., Koch, R., Rauch, G.-J., White, S., ... Stemple, D. L. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496(7446), 498-503. <https://doi.org/10.1038/nature12111>
- Hoye, M. L., Koval, E. D., Wegener, A. J., Hyman, T. S., Yang, C., O'Brien, D. R., Miller, R. L., Cole, T., Schoch, K. M., Shen, T., Kunikata, T., Richard, J.-P., Gutmann, D. H., Maragakis, N. J., Kordasiewicz, H. B., Dougherty, J. D., & Miller, T. M. (2017). MicroRNA Profiling Reveals Marker of Motor Neuron Disease in ALS Models. *The Journal of Neuroscience*, 37(22), 5574 LP - 5586. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3582-16.2017>
- Huang, C., Zhou, H., Tong, J., Chen, H., Liu, Y.-J., Wang, D., Wei, X., & Xia, X.-G. (2011). FUS Transgenic Rats Develop the Phenotypes of Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Lobar Degeneration. *PLOS Genetics*, 7(3), e1002011. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002011>
- Huntzinger, E., & Izaurralde, E. (2011). Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nature Reviews Genetics*, 12(2), 99-110. <https://doi.org/10.1038/nrg2936>
- Ignjatović, A., Stević, Z., Lavrnić, S., Daković, M., & Bačić, G. (2013). Brain iron MRI: A biomarker for amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 38(6), 1472-1479. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jmri.24121>
- Ikenaka, K., Kawai, K., Katsuno, M., Huang, Z., Jiang, Y.-M., Iguchi, Y., Kobayashi, K., Kimata, T., Waza, M., Tanaka, F., Mori, I., & Sobue, G. (2013). dnc-1/dynactin 1 Knockdown Disrupts Transport of Autophagosomes and Induces Motor Neuron Degeneration. *PloS one*, 8, e54511. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054511>
- Ingre, C., Roos, P. M., Piehl, F., Kamel, F., & Fang, F. (2015). Risk factors for amyotrophic lateral sclerosis. En *Clinical Epidemiology*. <https://doi.org/10.2147/CLEP.S37505>
- Ito, Y., Ofengeim, D., Najafov, A., Das, S., Saberi, S., Li, Y., Hitomi, J., Zhu, H., Chen, H., Mayo, L., Geng, J., Amin, P., DeWitt, J. P., Mookhtiar, A. K., Florez, M., Ouchida, A. T., Fan, J., Pasparakis, M., Kelliher, M. A., ... Yuan, J. (2016). RIPK1 mediates axonal degeneration by promoting inflammation and necroptosis in ALS. *Science*, 353(6299), 603 LP - 608. <https://doi.org/10.1126/science.aaf6803>
- Izhar, L., Adamson, B., Ciccia, A., Lewis, J., Pontano-Vaites, L., Leng, Y., Liang, A. C., Westbrook, T. F., Harper, J. W., & Elledge, S. J. (2015). A Systematic Analysis of Factors Localized to Damaged Chromatin Reveals PARP-Dependent Recruitment of Transcription Factors. *Cell Reports*, 11(9), 1486-1500. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.04.053>
- Jara, J. H., Genç, B., Stanford, M. J., Pytel, P., Roos, R. P., Weintraub, S., Mesulam, M. M., Bigio, E. H., Miller, R. J., & Özdinler, P. H. (2017). Evidence for an early innate immune response in the motor cortex of ALS. *Journal of Neuroinflammation*, 14(1), 129. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0896-4>
- Jiang, J., Zhu, Q., Gendron, T. F., Saberi, S., McAlonis-Downes, M., Seelman, A., Stauffer, J. E., Jafar-nejad, P., Drenner, K., Schulte, D., Chun, S., Sun, S., Ling, S.-C., Myers, B., Engelhardt, J., Katz, M., Baughn, M., Platoshyn, O., Marsala, M., ... Lagier-Tourenne, C. (2016). Gain of Toxicity from ALS/FTD-Linked Repeat Expansions in *C9ORF72* Is Alleviated by Antisense Oligonucleotides Targeting GGGGCC-Containing RNAs. *Neuron*, 90(3), 535-550. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.04.006>

- Jin, X.-F., Wu, N., Wang, L., & Li, J. (2013). Circulating MicroRNAs: A Novel Class of Potential Biomarkers for Diagnosing and Prognosing Central Nervous System Diseases. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 33(5), 601-613. <https://doi.org/10.1007/s10571-013-9940-9>
- Johann, S., Heitzer, M., Kanagaratnam, M., Goswami, A., Rizo, T., Weis, J., Troost, D., & Beyer, C. (2015). NLRP3 inflammasome is expressed by astrocytes in the SOD1 mouse model of ALS and in human sporadic ALS patients. *Glia*, 63(12), 2260-2273. <https://doi.org/10.1002/glia.22891>
- Joyce, P. I., Fratta, P., Fisher, E. M. C., & Acevedo-Arozena, A. (2011). SOD1 and TDP-43 animal models of amyotrophic lateral sclerosis: Recent advances in understanding disease toward the development of clinical treatments. *Mammalian Genome*. <https://doi.org/10.1007/s00335-011-9339-1>
- Jużwik, C. A., S. Drake, S., Zhang, Y., Paradis-Isler, N., Sylvester, A., Amar-Zifkin, A., Douglas, C., Morquette, B., Moore, C. S., & Fournier, A. E. (2019). microRNA dysregulation in neurodegenerative diseases: A systematic review. *Progress in Neurobiology*, 182, 101664. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2019.101664>
- Kabashi, E., Bercier, V., Lissouba, A., Liao, M., Brustein, E., Rouleau, G. A., & Drapeau, P. (2011). Fus and tdrdbp but not sod1 interact in genetic models of amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS Genetics*. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002214>
- Kabashi, E., Valdmanis, P. N., Dion, P., Spiegelman, D., McConkey, B. J., Velde, C. Vande, Bouchard, J.-P., Lacomblez, L., Pochigaeva, K., Salachas, F., Pradat, P.-F., Camu, W., Meininger, V., Dupre, N., & Rouleau, G. A. (2008). TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Genetics*, 40(5), 572-574. <https://doi.org/10.1038/ng.132>
- Kafkafi, N., Agassi, J., Chesler, E. J., Crabbe, J. C., Crusio, W. E., Eilam, D., Gerlai, R., Golani, I., Gomez-Marin, A., Heller, R., Iraqi, F., Jaljuli, I., Karp, N. A., Morgan, H., Nicholson, G., Pfaff, D. W., Richter, S. H., Stark, P. B., Stiedl, O., ... Benjamini, Y. (2018). Reproducibility and replicability of rodent phenotyping in preclinical studies. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 87, 218-232. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.01.003>
- Kaji, R., Imai, T., Iwasaki, Y., Okamoto, K., Nakagawa, M., Ohashi, Y., Takase, T., Hanada, T., Shimizu, H., Tashiro, K., & Kuzuhara, S. (2019). Ultra-high-dose methylcobalamin in amyotrophic lateral sclerosis: a long-term phase II/III randomised controlled study. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 90(4), 451 LP - 457. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2018-319294>
- Kalmar, B., Novoselov, S., Gray, A., Cheetham, M. E., Margulis, B., & Greensmith, L. (2008). Late stage treatment with arimoclomol delays disease progression and prevents protein aggregation in the SOD1G93A mouse model of ALS. *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05595.x>
- Kashlan, O. N., Kashlan, B. N., Oh, S. S., McGinley, L. M., Chen, K. S., Kupfer, R., Erman, A., Sakowski, S. A., & Feldman, E. L. (2015). Histological Bulbar Manifestations in the ALS Rat. *Neuro-degenerative diseases*, 15(2), 121—126. <https://doi.org/10.1159/000377725>
- Kieran, D., Kalmar, B., Dick, J. R. T., Riddoch-Contreras, J., Burnstock, G., & Greensmith, L. (2004). Treatment with arimoclomol, a coinducer of heat shock proteins, delays disease progression in ALS mice. *Nature Medicine*, 10(4), 402-405. <https://doi.org/10.1038/nm1021>

- Kiernan, M. C., Vucic, S., Cheah, B. C., Turner, M. R., Eisen, A., Hardiman, O., Burrell, J. R., & Zoing, M. C. (2011). Amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61156-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61156-7)
- Kim, G., Gautier, O., Tassoni-Tsuchida, E., Ma, X. R., & Gitler, A. D. (2020). ALS Genetics: Gains, Losses, and Implications for Future Therapies. *Neuron*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.08.022>
- Kjældgaard, A. L., Pilely, K., Olsen, K. S., Pedersen, S. W., Lauritsen, A. Ø., Møller, K., & Garred, P. (2018). Amyotrophic lateral sclerosis: The complement and inflammatory hypothesis. *Molecular Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.06.007>
- Kobuchi, S., Yazaki, Y., Ito, Y., & Sakaeda, T. (2018). Circadian variations in the pharmacokinetics of capecitabine and its metabolites in rats. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 112, 152-158. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.11.021>
- Koval, E. D., Shaner, C., Zhang, P., du Maine, X., Fischer, K., Tay, J., Chau, B. N., Wu, G. F., & Miller, T. M. (2013). Method for widespread microRNA-155 inhibition prolongs survival in ALS-model mice. *Human Molecular Genetics*, 22(20), 4127-4135. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt261>
- Krol, J., Loedige, I., & Filipowicz, W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature Reviews Genetics*, 11(9), 597-610. <https://doi.org/10.1038/nrg2843>
- Kryndushkin, D., & Shewmaker, F. (2011). Modeling ALS and FTLN proteinopathies in yeast: An efficient approach for studying protein aggregation and toxicity. *Prion*, 5(4), 250-257. <https://doi.org/10.4161/pri.17229>
- Lacomblez, L., Bensimon, G., Leigh, P. N., Guillet, P., & Meininger, V. (1996). Dose-ranging study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. Amyotrophic Lateral Sclerosis/Riluzole Study Group II. *Lancet (London, England)*, 347(9013), 1425–1431. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(96\)91680-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(96)91680-3)
- Laferrière, F., & Polymenidou, M. (2015). Advances and challenges in understanding the multifaceted pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *En Swiss Medical Weekly*. <https://doi.org/10.4414/smw.2015.14054>
- Laird, A. S., van Hoecke, A., De Muynck, L., Timmers, M., van den Bosch, L., Van Damme, P., & Robberecht, W. (2010). Progranulin is neurotrophic in vivo and protects against a mutant TDP-43 induced axonopathy. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013368>
- Lam, S. W., Guchelaar, H. J., & Boven, E. (2016). The role of pharmacogenetics in capecitabine efficacy and toxicity. *Cancer Treatment Reviews*, 50, 9-22. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2016.08.001>
- Lambrechts, R., Faber, A., & Sibon, O. (2017). Modelling in miniature: Using *Drosophila melanogaster* to study human neurodegeneration. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 25-26, 3-10. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2018.09.004>
- Lanson Jr, N. A., Maltare, A., King, H., Smith, R., Kim, J. H., Taylor, J. P., Lloyd, T. E., & Pandey, U. B. (2011). A *Drosophila* model of FUS-related neurodegeneration reveals genetic interaction between FUS and TDP-43. *Human Molecular Genetics*, 20(13), 2510-2523. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr150>

- Laslo, P., Lipski, J., Nicholson, L. F. B., Miles, G. B., & Funk, G. D. (2001). GluR2 AMPA Receptor Subunit Expression in Motoneurons at Low and High Risk for Degeneration in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Experimental Neurology*, 169(2), 461-471. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/exnr.2001.7653>
- Le Pichon, C. E., Dominguez, S. L., Solanoy, H., Ngu, H., Lewin-Koh, N., Chen, M., Eastham-Anderson, J., Watts, R., & Scearce-Levie, K. (2013). EGFR Inhibitor Erlotinib Delays Disease Progression but Does Not Extend Survival in the SOD1 Mouse Model of ALS. *PLOS ONE*, 8(4), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062342>
- Lee, J., Hyeon, S. J., Im, H., Ryu, H., Kim, Y., & Ryu, H. (2016). Astrocytes and Microglia as Non-cell Autonomous Players in the Pathogenesis of ALS. *Experimental Neurobiology*, 25(5), 233-240. <https://doi.org/10.5607/en.2016.25.5.233>
- Lee, J. K., Shin, J. H., Gwag, B. J., & Choi, E.-J. (2015). Iron accumulation promotes TACE-mediated TNF- α secretion and neurodegeneration in a mouse model of ALS. *Neurobiology of Disease*, 80, 63-69. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.05.009>
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), 843-854. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-Y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-Y)
- Lee, Y.-B., Chen, H.-J., Peres, J. N., Gomez-Deza, J., Attig, J., Štalekar, M., Troakes, C., Nishimura, A. L., Scotter, E. L., Vance, C., Adachi, Y., Sardone, V., Miller, J. W., Smith, B. N., Gallo, J.-M., Ule, J., Hirth, F., Rogelj, B., Houart, C., & Shaw, C. E. (2013). Hexanucleotide Repeats in ALS/FTD Form Length-Dependent RNA Foci, Sequester RNA Binding Proteins, and Are Neurotoxic. *Cell Reports*, 5(5), 1178-1186. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.10.049>
- Lehmann, S., Esch, E., Hartmann, P., Goswami, A., Nikolin, S., Weis, J., Beyer, C., & Johann, S. (2018). Expression profile of pattern recognition receptors in skeletal muscle of SOD1(G93A) amyotrophic lateral sclerosis (ALS) mice and sporadic ALS patients. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 44(6), 606-627. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/nan.12483>
- Lepore, E., Casola, I., Dobrowolny, G., & Musaro, A. (2019). Neuromuscular Junction as an Entity of Nerve-Muscle Communication. *Cells*, 8, 906. <https://doi.org/10.3390/cells8080906>
- Lettieri N, Aispuru GR, Aquino Esperanza JA, Aguirre MV, B. N. (2006). *Cambios cualitativos y cuantitativos producidos por dosis diferentes de 5-fluouracilo en células esplénicas.*
- Li, J., & Le, W. (2013). Modeling neurodegenerative diseases in *Caenorhabditis elegans*. *Experimental Neurology*, 250, 94-103. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.09.024>
- Liachko, N. F., Saxton, A. D., McMillan, P. J., Strovas, T. J., Currey, H. N., Taylor, L. M., Wheeler, J. M., Oblak, A. L., Ghetti, B., Montine, T. J., Keene, C. D., Raskind, M. A., Bird, T. D., & Kraemer, B. C. (2016). The phosphatase calcineurin regulates pathological TDP-43 phosphorylation. *Acta Neuropathologica*, 132(4), 545-561. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1600-y>
- Liao, B., Zhao, W., Beers, D. R., Henkel, J. S., & Appel, S. H. (2012). Transformation from a neuroprotective to a neurotoxic microglial phenotype in a mouse model of ALS. *Experimental Neurology*, 237(1), 147-152. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.06.011>

- Lindström, M., & Liu, B. (2018). Yeast as a Model to Unravel Mechanisms Behind FUS Toxicity in Amyotrophic Lateral Sclerosis. En *Frontiers in Molecular Neuroscience* (Vol. 11, p. 218). <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00218>
- Liu, J., & Wang, F. (2017). Role of Neuroinflammation in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Cellular Mechanisms and Therapeutic Implications . En *Frontiers in Immunology* (Vol. 8, p. 1005). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01005>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25(4), 402-408. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lladó, J., Haenggeli, C., Pardo, A., Wong, V., Benson, L., Coccia, C., Rothstein, J. D., Shefner, J. M., & Maragakis, N. J. (2006). Degeneration of respiratory motor neurons in the SOD1 G93A transgenic rat model of ALS. *Neurobiology of Disease*, 21(1), 110-118. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nbd.2005.06.019>
- Logroscino, G., & Piccininni, M. (2019). Amyotrophic lateral sclerosis descriptive epidemiology: The origin of geographic difference. En *Neuroepidemiology*. <https://doi.org/10.1159/000493386>
- Longley, D. B., Harkin, D. P., & Johnston, P. G. (2003). 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer*, 3(5), 330-338. <https://doi.org/10.1038/nrc1074>
- Lu, H., Liu, X., Deng, Y., & Qing, H. (2013). DNA methylation, a hand behind neurodegenerative diseases . En *Frontiers in Aging Neuroscience* (Vol. 5, p. 85). <https://doi.org/10.3389/fnagi.2013.00085>
- Ludolph, A. C., Bendotti, C., Blaugrund, E., Chio, A., Greensmith, L., Loeffler, J.-P., Mead, R., Niessen, H. G., Petri, S., Pradat, P.-F., Robberecht, W., Ruegg, M., Schwalenstöcker, B., Stiller, D., van den Berg, L., Vieira, F., & von Horsten, S. (2010). Guidelines for preclinical animal research in ALS/MND: A consensus meeting. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, 11(1-2), 38-45. <https://doi.org/10.3109/17482960903545334>
- Ludolph, A. C., Schuster, J., Dorst, J., Dupuis, L., Dreyhaupt, J., Weishaupt, J. H., Kassubek, J., Weiland, U., Petri, S., Meyer, T., Grosskreutz, J., Schrank, B., Boentert, M., Emmer, A., Hermann, A., Zeller, D., Prudlo, J., Winkler, A. S., Grehl, T., ... Zeller, D. (2018). Safety and efficacy of rasagiline as an add-on therapy to riluzole in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised, double-blind, parallel-group, placebo-controlled, phase 2 trial. *The Lancet Neurology*, 17(8), 681-688. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30176-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30176-5)
- Lundberg, I., Kratz, A.-K., Alexanderson, H., & Patarroyo, M. (2000). Decreased expression of interleukin-1 α , interleukin-1 β , and cell adhesion molecules in muscle tissue following corticosteroid treatment in patients with polymyositis and dermatomyositis. *Arthritis & Rheumatism*, 43(2), 336-348. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200002\)43:2<336::AID-ANR13>3.0.CO;2-V](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1529-0131(200002)43:2<336::AID-ANR13>3.0.CO;2-V)
- Lutz, C. (2018). Mouse models of ALS: Past, present and future. En *Brain Research*. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.03.024>
- Macchi, Z., Wang, Y., Moore, D., Katz, J., Saperstein, D., Walk, D., Simpson, E., Genge, A., Bertorini, T., Fernandes, J. A., Swenson, A., Elman, L., Dimachkie, M., Herbelin, L., Miller, J., Lu, J., Wilkins, H., Swerdlow, R. H., Statland, J., & Barohn, R. (2015). A multi-center

- screening trial of rasagiline in patients with amyotrophic lateral sclerosis: Possible mitochondrial biomarker target engagement. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*, 16(5-6), 345-352. <https://doi.org/10.3109/21678421.2015.1026826>
- Mackenzie, I. R. A., Rademakers, R., & Neumann, M. (2010). TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *The Lancet Neurology*, 9(10), 995-1007. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70195-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70195-2)
- Madabhushi, R., Pan, L., & Tsai, L.-H. (2014). DNA Damage and Its Links to Neurodegeneration. *Neuron*, 83(2), 266-282. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.06.034>
- Malet-Martino, M., & Martino, R. (2002). Clinical Studies of Three Oral Prodrugs of 5-Fluorouracil (Capecitabine, UFT, S-1): A Review. *The Oncologist*, 7(4), 288-323. <https://doi.org/https://doi.org/10.1634/theoncologist.7-4-288>
- Malyshev, I., & Malyshev, Y. (2015). Current concept and update of the macrophage plasticity concept: Intracellular mechanisms of reprogramming and M3 macrophage «switch» phenotype. En *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2015/341308>
- Mancuso, R., & Navarro, X. (2015). Amyotrophic lateral sclerosis: Current perspectives from basic research to the clinic. *Progress in Neurobiology*, 133, 1-26. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.07.004>
- Mancuso, R., Oliván, S., Mancera, P., Pastén-Zamorano, A., Manzano, R., Casas, C., Osta, R., & Navarro, X. (2012). Effect of genetic background on onset and disease progression in the SOD1-G93A model of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, 13(3), 302-310. <https://doi.org/10.3109/17482968.2012.662688>
- Mancuso, R., Osta, R., & Navarro, X. (2014). Presymptomatic electrophysiological tests predict clinical onset and survival in SOD1G93A ALS mice. *Muscle & Nerve*, 50(6), 943-949. <https://doi.org/10.1002/mus.24237>
- Mandrioli, J., D'Amico, R., Zucchi, E., Gessani, A., Fini, N., Fasano, A., Caponnetto, C., Chiò, A., Dalla Bella, E., Lunetta, C., Mazzini, L., Marinou, K., Sorarù, G., de Biasi, S., Lo Tartaro, D., Pinti, M., Cossarizza, A., & group, R.-A. investigators. (2018). Rapamycin treatment for amyotrophic lateral sclerosis: Protocol for a phase II randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter, clinical trial (RAP-ALS trial). *Medicine*, 97(24). <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000011119>
- Mantovani, S., Garbelli, S., Pasini, A., Alimonti, D., Perotti, C., Melazzini, M., Bendotti, C., & Mora, G. (2009). Immune system alterations in sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients suggest an ongoing neuroinflammatory process. *Journal of Neuroimmunology*. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2009.02.012>
- Manzano, R, Toivonen, J. M., Oliván, S., Calvo, A. C., Moreno-Igoa, M., Muñoz, M. J., Zaragoza, P., García-Redondo, A., & Osta, R. (2011). Altered Expression of Myogenic Regulatory Factors in the Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurodegenerative Diseases*, 8(5), 386-396. <https://doi.org/10.1159/000324159>
- Manzano, Raquel, Toivonen, J. M., Moreno-Martínez, L., de la Torre, M., Moreno-García, L., López-Royo, T., Molina, N., Zaragoza, P., Calvo, A. C., & Osta, R. (2020). What skeletal muscle has to say in ALS: implications for therapy. *British Journal of Pharmacology*, n/a(n/a). <https://doi.org/10.1111/bph.15276>

- Marchetti, C. (2019). The NLRP3 Inflammasome as a Pharmacological Target. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 74, 1. <https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000718>
- Marin, B., Boumé diene, F., Logroscino, G., Couratier, P., Babron, M. C., Leutenegger, A. L., Copetti, M., Preux, P. M., & Beghi, E. (2017). Variation in world wide incidence of amyotrophic lateral sclerosis: A meta-analysis. *International Journal of Epidemiology*. <https://doi.org/10.1093/ije/dyw061>
- Martínez-Muriana, A., Pastor, D., Mancuso, R., Rando, A., Osta, R., Martínez, S., López-Vales, R., & Navarro, X. (2020). Combined intramuscular and intraspinal transplant of bone marrow cells improves neuromuscular function in the SOD1G93A mice. *Stem Cell Research and Therapy*. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-1573-6>
- Masopust, D., Sivula, C. P., & Jameson, S. C. (2017). Of Mice, Dirty Mice, and Men: Using Mice To Understand Human Immunology. *The Journal of Immunology*, 199(2), 383 LP - 388. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700453>
- Mathis, S., Goizet, C., Soulages, A., Vallat, J. M., & Masson, G. Le. (2019). Genetics of amyotrophic lateral sclerosis: A review. En *Journal of the Neurological Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2019.02.030>
- McBride, M., Foley, K., D'souza, D., Li, Y., Lau, T., Hawke, T., & Schertzer, J. (2017). The NLRP3 inflammasome contributes to sarcopenia and lower muscle glycolytic potential in old mice. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism*, 313, ajpendo.00060.2017. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00060.2017>
- McGoldrick, P., Joyce, P. I., Fisher, E. M. C., & Greensmith, L. (2013). Rodent models of amyotrophic lateral sclerosis. En *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.03.012>
- Miller, T., Cudkowicz, M., Shaw, P. J., Andersen, P. M., Atassi, N., Bucelli, R. C., Genge, A., Glass, J., Ladha, S., Ludolph, A. L., Maragakis, N. J., McDermott, C. J., Pestronk, A., Ravits, J., Salachas, F., Trudell, R., Van Damme, P., Zinman, L., Bennett, C. F., ... Ferguson, T. A. (2020). Phase 1-2 Trial of Antisense Oligonucleotide Tofersen for SOD1 ALS. *The New England journal of medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2003715>
- MITSUMOTO, H., & BRADLEY, W. G. (1982). MURINE MOTOR NEURON DISEASE (THE WOBBLER MOUSE): DEGENERATION AND REGENERATION OF THE LOWER MOTOR NEURON1. *Brain*, 105(4), 811-834. <https://doi.org/10.1093/brain/105.4.811>
- Mitsumoto, H., Santella, R. M., Liu, X., Bogdanov, M., Zipprich, J., Wu, H.-C., Mahata, J., Kilty, M., Bednarz, K., Bell, D., Gordon, P. H., Hornig, M., Mehrazin, M., Naini, A., Flint Beal, M., & Factor-Litvak, P. (2008). Oxidative stress biomarkers in sporadic ALS. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, 9(3), 177-183. <https://doi.org/10.1080/17482960801933942>
- Miura, K., Kinouchi, M., Ishida, K., Fujibuchi, W., Naitoh, T., Ogawa, H., Ando, T., Yazaki, N., Watanabe, K., Haneda, S., Shibata, C., & Sasaki, I. (2010). 5-FU metabolism in cancer and orally-administrable 5-FU drugs. En *Cancers*. <https://doi.org/10.3390/cancers2031717>
- Miwa, M., Ura, M., Nishida, M., Sawada, N., Ishikawa, T., Mori, K., Shimma, N., Umeda, I., & Ishitsuka, H. (1998). Design of a novel oral fluoropyrimidine carbamate, capecitabine, which generates 5-fluorouracil selectively in tumours by enzymes concentrated in human liver and cancer tissue. *European Journal of Cancer*, 34(8), 1274-1281. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(98\)00058-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0959-8049(98)00058-6)

- Miyazaki, K., Ohta, Y., Nagai, M., Morimoto, N., Kurata, T., Takehisa, Y., Ikeda, Y., Matsuura, T., & Abe, K. (2011). Disruption of neurovascular unit prior to motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroscience Research*. <https://doi.org/10.1002/jnr.22594>
- Mizwicki, M. T., Fiala, M., Magpantay, L., Aziz, N., Sayre, J., Liu, G., Siani, A., Chan, D., Martinez-Maza, O., Chattopadhyay, M., & La Cava, A. (2012). Tocilizumab attenuates inflammation in ALS patients through inhibition of IL6 receptor signaling. *American Journal of Neurodegenerative Diseases*.
- Mojardín, L., Botet, J., Quintales, L., Moreno, S., & Salas, M. (2013). New insights into the RNA-based mechanism of action of the anticancer drug 5'-fluorouracil in eukaryotic cells. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078172>
- Molliex, A., Temirov, J., Lee, J., Coughlin, M., Kanagaraj, A. P., Kim, H. J., Mittag, T., & Taylor, J. P. (2015). Phase Separation by Low Complexity Domains Promotes Stress Granule Assembly and Drives Pathological Fibrillization. *Cell*, *163*(1), 123-133. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.015>
- Monahan, Z. T., Rhoads, S. N., Yee, D. S., & Shewmaker, F. P. (2018). Yeast Models of Prion-Like Proteins That Cause Amyotrophic Lateral Sclerosis Reveal Pathogenic Mechanisms. En *Frontiers in Molecular Neuroscience* (Vol. 11, p. 453). doi: 10.3389/fnmol.2018.00453
- Mora, J. S., Genge, A., Chio, A., Estol, C. J., Chaverri, D., Hernández, M., Marín, S., Mascias, J., Rodríguez, G. E., Povedano, M., Paipa, A., Dominguez, R., Gamez, J., Salvado, M., Lunetta, C., Ballario, C., Riva, N., Mandrioli, J., Moussy, A., ... Hermine, O. (2020). Masitinib as an add-on therapy to riluzole in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomized clinical trial. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*, *21*(1-2), 5-14. <https://doi.org/10.1080/21678421.2019.1632346>
- Moreno-Igoa, M., Calvo, A. C., Penas, C., Manzano, R., Oliván, S., Muñoz, M. J., Mancuso, R., Zaragoza, P., Aguilera, J., Navarro, X., & Osta Pinzolas, R. (2010). Fragment C of tetanus toxin, more than a carrier. Novel perspectives in non-viral ALS gene therapy. *Journal of Molecular Medicine*, *88*(3), 297-308. <https://doi.org/10.1007/s00109-009-0556-y>
- Moreno-Martinez, L., De La Torre, M., Muñoz, M. J., Zaragoza, P., Aguilera, J., Calvo, A. C., & Osta, R. (2020). Neuroprotective fragment C of tetanus toxin modulates IL-6 in an ALS mouse model. *Toxins*. <https://doi.org/10.3390/toxins12050330>
- Moreno García, L. (2017). *El inflammasoma NLRP3 como biomarcador molecular en la esclerosis lateral amiotrófica*. Universidad de Zaragoza.
- Morimoto, N., Nagai, M., Ohta, Y., Miyazaki, K., Kurata, T., Morimoto, M., Murakami, T., Takehisa, Y., Ikeda, Y., Kamiya, T., & Abe, K. (2007). Increased autophagy in transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. *Brain Research*, *1167*, 112-117. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.06.045>
- Morrice, J. R., Gregory-Evans, C. Y., & Shaw, C. A. (2018). Modeling Environmentally-Induced Motor Neuron Degeneration in Zebrafish. *Scientific Reports*, *8*(1), 4890. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23018-w>
- Nair, R. R., Corrochano, S., Gasco, S., Tibbit, C., Thompson, D., Maduro, C., Ali, Z., Fratta, P., Arozena, A. A., Cunningham, T. J., & Fisher, E. M. C. (2019). Uses for humanised mouse models in precision medicine for neurodegenerative disease. En *Mammalian Genome*.

<https://doi.org/10.1007/s00335-019-09807-2>

- Nardone, R., Höller, Y., Taylor, A. C., Lochner, P., Tezzon, F., Golaszewski, S., Brigo, F., & Trinká, E. (2016). Canine degenerative myelopathy: a model of human amyotrophic lateral sclerosis. *Zoology*, *119*(1), 64-73. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.zool.2015.09.003>
- Nasevicius, A., & Ekker, S. C. (2000). Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nature Genetics*, *26*(2), 216-220. <https://doi.org/10.1038/79951>
- Neumann, M., Sampathu, D. M., Kwong, L. K., Truax, A. C., Micsenyi, M. C., Chou, T. T., Bruce, J., Schuck, T., Grossman, M., Clark, C. M., McCluskey, L. F., Miller, B. L., Masliah, E., Mackenzie, I. R., Feldman, H., Feiden, W., Kretzschmar, H. A., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. Y. (2006). Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1134108>
- Nguyen, H. P., Van Broeckhoven, C., & van der Zee, J. (2018). ALS Genes in the Genomic Era and their Implications for FTD. *Trends in Genetics*, *34*(6), 404-423. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.03.001>
- Nicholson, K., Chan, J., Macklin, E. A., Levine-Weinberg, M., Breen, C., Bakshi, R., Grasso, D. L., Wills, A.-M., Jahandideh, S., Taylor, A. A., Beaulieu, D., Ennist, D. L., Andronesi, O., Ratai, E.-M., Schwarzschild, M. A., Cudkowicz, M., & Paganoni, S. (2018). Pilot trial of inosine to elevate urate levels in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, *5*(12), 1522-1533. <https://doi.org/10.1002/acn3.671>
- Nolan, M., Talbot, K., & Ansorge, O. (2016). Pathogenesis of FUS-associated ALS and FTD: insights from rodent models. *Acta Neuropathologica Communications*, *4*(1), 99. <https://doi.org/10.1186/s40478-016-0358-8>
- Nowicka, N., Juranek, J., Juranek, J. K., & Wojtkiewicz, J. (2019). Risk factors and emerging therapies in amyotrophic lateral sclerosis. En *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms20112616>
- Nuzziello, N., & Liguori, M. (2019). The MicroRNA Centrism in the Orchestration of Neuroinflammation in Neurodegenerative Diseases. En *Cells*. <https://doi.org/10.3390/cells8101193>
- O'Connell, R. M., Rao, D. S., Chaudhuri, A. A., & Baltimore, D. (2010). Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nature Reviews Immunology*, *10*(2), 111-122. <https://doi.org/10.1038/nri2708>
- Offen, D., Barhum, Y., Melamed, E., Embacher, N., Schindler, C., & Ransmayr, G. (2009). Spinal Cord mRNA Profile in Patients with ALS: Comparison with Transgenic Mice Expressing the Human SOD-1 Mutant. *Journal of Molecular Neuroscience*, *38*(2), 85-93. <https://doi.org/10.1007/s12031-007-9004-z>
- Oliván, S., Calvo, A. C., Rando, A., Muñoz, M. J., Zaragoza, P., & Osta, R. (2014). Comparative study of behavioural tests in the SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Experimental Animals*. <https://doi.org/10.1538/expanim.14-0077>
- Oliván, S., Martínez-Beamonte, R., Calvo, A. C., Surra, J. C., Manzano, R., Arnal, C., Osta, R., & Osada, J. (2014). Extra virgin olive oil intake delays the development of amyotrophic lateral sclerosis associated with reduced reticulum stress and autophagy in muscle of SOD1G93A mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *25*(8), 885-892. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.04.005>

- Oskarsson, B., Gendron, T. F., & Staff, N. P. (2018). Amyotrophic Lateral Sclerosis: An Update for 2018. En *Mayo Clinic Proceedings*. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2018.04.007>
- Paez-Colasante, X., Figueroa-Romero, C., Sakowski, S. A., Goutman, S. A., & Feldman, E. L. (2015). Amyotrophic lateral sclerosis: Mechanisms and therapeutics in the epigenomic era. En *Nature Reviews Neurology*. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2015.57>
- Paganoni, S., Nicholson, K., Chan, J., Shui, A., Schoenfeld, D., Sherman, A., Berry, J., Cudkovicz, M., Atassi, N., & Consortium, for the P. R. O.-A. A. L. S. C. T. (2018). Urate levels predict survival in amyotrophic lateral sclerosis: Analysis of the expanded Pooled Resource Open-Access ALS clinical trials database. *Muscle & Nerve*, 57(3), 430-434. <https://doi.org/10.1002/mus.25950>
- Paganoni, S., Zhang, M., Quiroz Zárata, A., Jaffa, M., Yu, H., Cudkovicz, M. E., & Wills, A.-M. (2012). Uric acid levels predict survival in men with amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurology*, 259(9), 1923-1928. <https://doi.org/10.1007/s00415-012-6440-7>
- Palomo, G. M., & Manfredi, G. (2015). Exploring new pathways of neurodegeneration in ALS: The role of mitochondria quality control. *Brain Research*, 1607, 36-46. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.09.065>
- Papadeas, S. T., Kraig, S. E., O'Connor, Banion, C., Lepore, A. C., & Maragakis, N. J. (2011). Astrocytes carrying the superoxide dismutase 1 (SOD1^{G93A}) mutation induce wild-type motor neuron degeneration in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(43), 17803 LP - 17808. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103141108>
- Parone, P. A., Da Cruz, S., Han, J. S., McAlonis-Downes, M., Vetto, A. P., Lee, S. K., Tseng, E., & Cleveland, D. W. (2013). Enhancing Mitochondrial Calcium Buffering Capacity Reduces Aggregation of Misfolded SOD1 and Motor Neuron Cell Death without Extending Survival in Mouse Models of Inherited Amyotrophic Lateral Sclerosis. *The Journal of Neuroscience*, 33(11), 4657 LP - 4671. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1119-12.2013>
- Pasinelli, P., & Brown, R. H. (2006). Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(9), 710-723. <https://doi.org/10.1038/nrn1971>
- Peters, O. M., Ghasemi, M., & Brown Jr., R. H. (2015). Emerging mechanisms of molecular pathology in ALS. *The Journal of Clinical Investigation*, 125(5), 1767-1779. <https://doi.org/10.1172/JCI71601>
- Petillon, C., Hergesheimer, R., Puy, H., Corcia, P., Vourc'h, P., Andres, C., Karim, Z., & Blasco, H. (2019). The relevancy of data regarding the metabolism of iron to our understanding of deregulated mechanisms in ALS; hypotheses and pitfalls. *Frontiers in Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.01031>
- Pfohl, S. R., Halicek, M. T., & Mitchell, C. S. (2015). 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. *Journal of Neuromuscular Diseases*, 2, 137-150. <https://doi.org/10.3233/JND-140068>
- Philips, T., & Robberecht, W. (2011). Neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: role of glial activation in motor neuron disease. *The Lancet. Neurology*, 10(3), 253—263. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(11\)70015-1](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(11)70015-1)

- Philips, T., & Rothstein, J. D. (2015). Rodent models of amyotrophic lateral sclerosis. *Current Protocols in Pharmacology*. <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0567s69>
- Phillips, J. B., & Westerfield, M. (2014). Zebrafish models in translational research: tipping the scales toward advancements in human health. *Disease Models & Mechanisms*, 7(7), 739 LP - 743. <https://doi.org/10.1242/dmm.015545>
- Picher-Martel, V., Valdmanis, P. N., Gould, P. V., Julien, J. P., & Dupré, N. (2016). From animal models to human disease: A genetic approach for personalized medicine in ALS. En *Acta Neuropathologica Communications*. <https://doi.org/10.1186/s40478-016-0340-5>
- Pokrishevsky, E., McAlary, L., Farrowell, N. E., Zhao, B., Sher, M., Yerbury, J. J., & Cashman, N. R. (2018). Tryptophan 32-mediated SOD1 aggregation is attenuated by pyrimidine-like compounds in living cells. *Scientific Reports*, 8(1), 15590. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32835-y>
- Potenza, R. L., De Simone, R., Armida, M., Mazziotti, V., Pèzzola, A., Popoli, P., & Minghetti, L. (2016). Fingolimod: A Disease-Modifier Drug in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotherapeutics*, 13(4), 918-927. <https://doi.org/10.1007/s13311-016-0462-2>
- Qiu, H., Lee, S., Shang, Y., Wang, W.-Y., Au, K. F., Kamiya, S., Barmada, S. J., Finkbeiner, S., Lui, H., Carlton, C. E., Tang, A. A., Oldham, M. C., Wang, H., Shorter, J., Filiano, A. J., Roberson, E. D., Tourtellotte, W. G., Chen, B., Tsai, L.-H., & Huang, E. J. (2014). ALS-associated mutation FUS-R521C causes DNA damage and RNA splicing defects. *The Journal of Clinical Investigation*, 124(3), 981-999. <https://doi.org/10.1172/JCI72723>
- Qureshi, I. A., & Mehler, M. F. (2013). Epigenetic mechanisms governing the process of neurodegeneration. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(4), 875-882. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.06.011>
- Rando, A., De La Torre, M., Martínez-Muriana, A., Zaragoza, P., Musaro, A., Hernández, S., Navarro, X., Toivonen, J. M., & Osta, R. (2019). Chemotherapeutic agent 5-fluorouracil increases survival of SOD1 mouse model of ALS. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210752>
- Rando, A., Gasco, S., De La Torre, M., García-Redondo, A., Zaragoza, P., Toivonen, J. M., & Osta, R. (2016). Granulocyte colony-stimulating factor ameliorates skeletal muscle dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis mice and improves proliferation of SOD1-G93A myoblasts in vitro. *Neurodegenerative Diseases*. <https://doi.org/10.1159/000446113>
- Rando, A., Pastor, D., Viso-León, M. C., Martínez, A., Manzano, R., Navarro, X., Osta, R., & Martínez, S. (2018). Intramuscular transplantation of bone marrow cells prolongs the lifespan of SOD1G93A mice and modulates expression of prognosis biomarkers of the disease. *Stem Cell Research & Therapy*, 9(1), 90. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0843-z>
- Ravnik-Glavač, M., & Glavač, D. (2020). Circulating RNAs as potential biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. En *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms21051714>
- Re, D. B., Le Verche, V., Yu, C., Amoroso, M. W., Politi, K. A., Phani, S., Ikiz, B., Hoffmann, L., Koolen, M., Nagata, T., Papadimitriou, D., Nagy, P., Mitsumoto, H., Kariya, S., Wichterle, H., Henderson, C. E., & Przedborski, S. (2014). Necroptosis drives motor neuron death in models of both sporadic and familial ALS. *Neuron*.

<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.01.011>

- Rencus-Lazar, S., DeRowe, Y., Adsi, H., Gazit, E., & Laor, D. (2019). Yeast models for the study of amyloid-associated disorders and development of future therapy. En *Frontiers in Molecular Biosciences*. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2019.00015>
- Renton, A. E., Majounie, E., Waite, A., Simón-Sánchez, J., Rollinson, S., Gibbs, J. R., Schymick, J. C., Laaksovirta, H., van Swieten, J. C., Myllykangas, L., Kalimo, H., Paetau, A., Abramzon, Y., Remes, A. M., Kaganovich, A., Scholz, S. W., Duckworth, J., Ding, J., Harmer, D. W., ... Traynor, B. J. (2011). A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.09.010>
- Riancho, J., Gonzalo, I., Ruiz-Soto, M., & Berciano, J. (2019). Why do motor neurons degenerate? Actualization in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. En *Neurologia*. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2015.12.001>
- Rinchetti, P., Rizzuti, M., Faravelli, I., & Corti, S. (2018). MicroRNA Metabolism and Dysregulation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Molecular Neurobiology*, 55(3), 2617-2630. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0537-z>
- Robberecht, W., & Philips, T. (2013). The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis. En *Nature Reviews Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nrn3430>
- Rosen, D. R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D. A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J. P., Deng, H.-X., Rahmani, Z., Krizus, A., McKenna-Yasek, D., Cayabyab, A., Gaston, S. M., Berger, R., Tanzi, R. E., Halperin, J. J., Herzfeldt, B., ... Brown, R. H. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 362(6415), 59-62. <https://doi.org/10.1038/362059a0>
- Roser, A.-E., Tönges, L., & Lingor, P. (2017). Modulation of Microglial Activity by Rho-Kinase (ROCK) Inhibition as Therapeutic Strategy in Parkinson's Disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis. En *Frontiers in Aging Neuroscience* (Vol. 9, p. 94). doi: 10.3389/fnagi.2017.00094.
- Rosshart, S. P., Vassallo, B. G., Angeletti, D., Hutchinson, D. S., Morgan, A. P., Takeda, K., Hickman, H. D., McCulloch, J. A., Badger, J. H., Ajami, N. J., Trinchieri, G., Pardo-Manuel de Villena, F., Yewdell, J. W., & Rehermann, B. (2017). Wild Mouse Gut Microbiota Promotes Host Fitness and Improves Disease Resistance. *Cell*, 171(5), 1015-1028.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.016>
- Rothstein, J. D., Patel, S., Regan, M. R., Haenggeli, C., Huang, Y. H., Bergles, D. E., Jin, L., Dykes Hoberg, M., Vidensky, S., Chung, D. S., Toan, S. V., Bruijn, L. I., Su, Z., Gupta, P., & Fisher, P. B. (2005). β -Lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature*, 433(7021), 73-77. <https://doi.org/10.1038/nature03180>
- Rutherford, N. J., Zhang, Y. J., Baker, M., Gass, J. M., Finch, N. C. A., Xu, Y. F., Stewart, H., Kelley, B. J., Kuntz, K., Crook, R. J. P., Sreedharan, J., Vance, C., Sorenson, E., Lippa, C., Bigio, E. H., Geschwind, D. H., Knopman, D. S., Mitsumoto, H., Petersen, R. C., ... Rademakers, R. (2008). Novel mutations in TARDBP(TDP-43) in patients with familial amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS Genetics*. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000193>
- Sakowski, S. A., Lunn, J. S., Busta, A. S., Oh, S. S., Zamora-Berridi, G., Palmer, M., Rosenberg, A. A., Philip, S. G., Dowling, J. J., & Feldman, E. L. (2012). Neuromuscular effects of G93A-SOD1 expression in zebrafish. *Molecular neurodegeneration*, 7, 44. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-7-44>

- Santos-Pereira, J. M., & Aguilera, A. (2015). R loops: new modulators of genome dynamics and function. *Nature Reviews Genetics*, *16*(10), 583-597. <https://doi.org/10.1038/nrg3961>
- Sasaki, N., Imamura, Y., Sekiya, A., Itoh, M., & Furuoka, H. (2016). Four cases of equine motor neuron disease in Japan. En *Journal of Equine Science*. <https://doi.org/10.1294/jes.27.119>
- Sasaki, S. (2011). Autophagy in Spinal Cord Motor Neurons in Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, *70*(5), 349-359. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3182160690>
- Sayed, D., & Abdellatif, M. (2011). MicroRNAs in Development and Disease. *Physiological Reviews*, *91*(3), 827-887. <https://doi.org/10.1152/physrev.00006.2010>
- Scheperjans, F., Aho, V., Pereira, P. A. B., Koskinen, K., Paulin, L., Pekkonen, E., Haapaniemi, E., Kaakkola, S., Eerola-Rautio, J., Pohja, M., Kinnunen, E., Murros, K., & Auvinen, P. (2015). Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. *Movement Disorders*. <https://doi.org/10.1002/mds.26069>
- Schmalbruch, H., Jensen, H.-J. S., Bjærg, M., Kamieniecka, Z., & Kurland, L. (1991). A New Mouse Mutant with Progressive Motor Neuronopathy. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, *50*(3), 192-204. <https://doi.org/10.1097/00005072-199105000-00002>
- Schreij, A. M. A., Fon, E. A., & McPherson, P. S. (2016). Endocytic membrane trafficking and neurodegenerative disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *73*(8), 1529-1545. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2105-x>
- Schwenk, B. M., Hartmann, H., Serdaroglu, A., Schludi, M. H., Hornburg, D., Meissner, F., Orozco, D., Colombo, A., Tahirovic, S., Michaelsen, M., Schreiber, F., Haupt, S., Peitz, M., Brüstle, O., Küpper, C., Klopstock, T., Otto, M., Ludolph, A. C., Arzberger, T., ... Edbauer, D. (2016). TDP-43 loss of function inhibits endosomal trafficking and alters trophic signaling in neurons. *The EMBO Journal*, *35*(21), 2350-2370. <https://doi.org/10.15252/embj.201694221>
- Scott, S., Kranz, J., Cole, J., Lincecum, J., Thompson, K., Kelly, N., Bostrom, A., Theodoss, J., Al-Nakhala, B., Vieira, F., Ramasubbu, J., & Heywood, J. (2008). Design, power, and interpretation of studies in the standard murine model of ALS. *Amyotrophic lateral sclerosis: official publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases*, *9*, 4-15. <https://doi.org/10.1080/17482960701856300>
- Sheean, R. K., McKay, F. C., Cretney, E., Bye, C. R., Perera, N. D., Tomas, D., Weston, R. A., Scheller, K. J., Djouma, E., Menon, P., Schibeci, S. D., Marmash, N., Yerbury, J. J., Nutt, S. L., Booth, D. R., Stewart, G. J., Kiernan, M. C., Vucic, S., & Turner, B. J. (2018). Association of Regulatory T-Cell Expansion With Progression of Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Study of Humans and a Transgenic Mouse Model. *JAMA Neurology*, *75*(6), 681-689. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2018.0035>
- Sheedy, F. J. (2015). Turning 21: Induction of miR-21 as a key switch in the inflammatory response. En *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00019>
- Sheedy, F. J., Palsson-McDermott, E., Hennessy, E. J., Martin, C., O'Leary, J. J., Ruan, Q., Johnson, D. S., Chen, Y., & O'Neill, L. A. J. (2010). Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21. *Nature Immunology*, *11*(2), 141-147. <https://doi.org/10.1038/ni.1828>
- Shelkovnikova, T. A., Peters, O. M., Deykin, A. V., Connor-Robson, N., Robinson, H., Ustyugov, A. A., Bachurin, S. O., Ermolkevich, T. G., Goldman, I. L., Sadchikova, E. R., Kovrazhkina, E. A.,

- Skvortsova, V. I., Ling, S. C., Da Cruz, S., Parone, P. A., Buchman, V. L., & Ninkina, N. N. (2013). Fused in sarcoma (FUS) protein lacking nuclear localization signal (NLS) and major RNA binding motifs triggers proteinopathy and severe motor phenotype in transgenic mice. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.492017>
- Shi, P., Gal, J., Kwinter, D. M., Liu, X., & Zhu, H. (2010). Mitochondrial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. En *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.08.012>
- Shin, C., Nam, J.-W., Farh, K. K.-H., Chiang, H. R., Shkumatava, A., & Bartel, D. P. (2010). Expanding the MicroRNA Targeting Code: Functional Sites with Centered Pairing. *Molecular Cell*, 38(6), 789-802. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.06.005>
- Simpson, E. P., Henry, Y. K., Henkel, J. S., Smith, R. G., & Appel, S. H. (2004). Increased lipid peroxidation in sera of ALS patients. *Neurology*, 62(10), 1758 LP - 1765. <https://doi.org/10.1212/WNL.62.10.1758>
- Smith, E. F., Shaw, P. J., & De Vos, K. J. (2019). The role of mitochondria in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience Letters*, 710, 132933. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.06.052>
- Smith, R. A., Miller, T. M., Yamanaka, K., Monia, B. P., Condon, T. P., Hung, G., Lobsiger, C. S., Ward, C. M., McAlonis-Downes, M., Wei, H., Wancewicz, E. V., Bennett, C. F., & Cleveland, D. W. (2006). Antisense oligonucleotide therapy for neurodegenerative disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(8), 2290-2296. <https://doi.org/10.1172/JCI25424>
- Smith, R. G., Henry, Y. K., Mattson, M. P., & Appel, S. H. (1998). Presence of 4-hydroxynonenal in cerebrospinal fluid of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*, 44(4), 696-699. <https://doi.org/10.1002/ana.410440419>
- Sougiannis, A. T., VanderVeen, B. N., Enos, R. T., Velazquez, K. T., Bader, J. E., Carson, M., Chatzistamou, I., Walla, M., Pena, M. M., Kubinak, J. L., Nagarkatti, M., Carson, J. A., & Murphy, E. A. (2019). Impact of 5 fluorouracil chemotherapy on gut inflammation, functional parameters, and gut microbiota. *Brain, Behavior, and Immunity*. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.02.020>
- Statland, J. M., Moore, D., Wang, Y., Walsh, M., Mozaffar, T., Elman, L., Nations, S. P., Mitsumoto, H., Fernandes, J. A., Saperstein, D., Hayat, G., Herbelin, L., Karam, C., Katz, J., Wilkins, H. M., Agbas, A., Swerdlow, R. H., Santella, R. M., Dimachkie, M. M., ... Consortium, T. R. I. of the M. S. G. and W. A. L. S. (2019). Rasagiline for amyotrophic lateral sclerosis: A randomized, controlled trial. *Muscle & Nerve*, 59(2), 201-207. <https://doi.org/10.1002/mus.26335>
- Stephenson, J., & Amor, S. (2017). Modelling amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 25-26, 35-44. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2018.10.001>
- Su, Y., Wu, H., Pavlosky, A., Zou, L. L., Deng, X., Zhang, Z. X., & Jevnikar, A. M. (2016). Regulatory non-coding RNA: New instruments in the orchestration of cell death. En *Cell Death and Disease*. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.210>
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, 131(5), 861-872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>

- Takei, K., Takahashi, F., Liu, S., Tsuda, K., & Palumbo, J. (2017). Post-hoc analysis of randomised, placebo-controlled, double-blind study (MCI186-19) of edaravone (MCI-186) in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*, 18(sup1), 49-54. <https://doi.org/10.1080/21678421.2017.1361443>
- Taylor, D., Gibbs, B., Kabashi, E., Minotti, S., Durham, H., & Agar, J. (2007). Tryptophan 32 Potentiates Aggregation and Cytotoxicity of a Copper/Zinc Superoxide Dismutase Mutant Associated with Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *The Journal of biological chemistry*, 282, 16329-16335. <https://doi.org/10.1074/jbc.M610119200>
- Taylor, J. P., Brown, R. H., & Cleveland, D. W. (2016). Decoding ALS: From genes to mechanism. En *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature20413>
- Therrien, M., & Parker, J. A. (2014). Worming forward: amyotrophic lateral sclerosis toxicity mechanisms and genetic interactions in *Caenorhabditis elegans*. En *Frontiers in Genetics* (Vol. 5, p. 85). <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00085>
- Toivonen, J. M., Manzano, R., Oliván, S., Zaragoza, P., García-Redondo, A., & Osta, R. (2014). MicroRNA-206: A Potential Circulating Biomarker Candidate for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PLOS ONE*, 9(2), e89065. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089065>
- Toivonen, J. M., Oliván, S., & Osta, R. (2010). Tetanus toxin C-fragment: the courier and the cure? *Toxins*, 2(11), 2622-2644. <https://doi.org/10.3390/toxins2112622>
- Tremolizzo, L., Messina, P., Conti, E., Sala, G., Cecchi, M., Airoldi, L., Pastorelli, R., Pupillo, E., Bandettini Di Poggio, M., Filosto, M., Lunetta, C., Agliardi, C., Guerini, F., Mandrioli, J., Calvo, A., Beghi, E., Ferrarese, C., Cotelli, M. S., Corbo, M., ... Pisa, F. (2014). Whole-blood global DNA methylation is increased in amyotrophic lateral sclerosis independently of age of onset. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*, 15(1-2), 98-105. <https://doi.org/10.3109/21678421.2013.851247>
- Trias, E., Ibarburu, S., Barreto-Núñez, R., Babdor, J., Maciel, T. T., Guillo, M., Gros, L., Dubreuil, P., Díaz-Amarilla, P., Cassina, P., Martínez-Palma, L., Moura, I. C., Beckman, J. S., Hermine, O., & Barbeito, L. (2016). Post-paralysis tyrosine kinase inhibition with masitinib abrogates neuroinflammation and slows disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroinflammation*, 13(1), 177. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0620-9>
- Trias, E., King, P. H., Si, Y., Kwon, Y., Varela, V., Ibarburu, S., Kovacs, M., Moura, I. C., Beckman, J. S., Hermine, O., & Barbeito, L. (2018). Mast cells and neutrophils mediate peripheral motor pathway degeneration in ALS. *JCI Insight*, 3(19). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.123249>
- Turner, B. J., & Talbot, K. (2008). Transgenics, toxicity and therapeutics in rodent models of mutant SOD1-mediated familial ALS. *Progress in Neurobiology*, 85(1), 94-134. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2008.01.001>
- Turner, M. R., Bowser, R., Bruijn, L., Dupuis, L., Ludolph, A., McGrath, M., Manfredi, G., Maragakis, N., Miller, R. G., Pullman, S. L., Rutkove, S. B., Shaw, P. J., Shefner, J., & Fischbeck, K. H. (2013). Mechanisms, models and biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*, 14(sup1), 19-32. <https://doi.org/10.3109/21678421.2013.778554>
- Uchida, A., Sasaguri, H., Kimura, N., Tajiri, M., Ohkubo, T., Ono, F., Sakaue, F., Kanai, K., Hirai, T., Sano, T., Shibuya, K., Kobayashi, M., Yamamoto, M., Yokota, S., Kubodera, T., Tomori, M.,

- Sakaki, K., Enomoto, M., Hirai, Y., ... Yokota, T. (2012). Non-human primate model of amyotrophic lateral sclerosis with cytoplasmic mislocalization of TDP-43. *Brain*, *135*(3), 833-846. <https://doi.org/10.1093/brain/awr348>
- Udofot, O., Affram, K., Smith, T., Tshabe, B., Krishnan, S., Sachdeva, M., & Agyare, E. (2016). Pharmacokinetic, biodistribution and therapeutic efficacy of 5-fluorouracil-loaded pH-sensitive PEGylated liposomal nanoparticles in HCT-116 tumor bearing mouse. *Journal of nature and science*, *2* 1.
- Ugur, B., Chen, K., & Bellen, H. J. (2016). *Drosophila* tools and assays for the study of human diseases. *Disease Models & Mechanisms*, *9*(3), 235 LP - 244. <https://doi.org/10.1242/dmm.023762>
- Vallarola, A., Sironi, F., Tortarolo, M., Gatto, N., De Gioia, R., Pasetto, L., De Paola, M., Mariani, A., Ghosh, S., Watson, R., Kalmes, A., Bonetto, V., & Bendotti, C. (2018). RNS60 exerts therapeutic effects in the SOD1 ALS mouse model through protective glia and peripheral nerve rescue. *Journal of Neuroinflammation*, *15*(1), 65. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1101-0>
- Van Damme, P., Robberecht, W., & Van Den Bosch, L. (2017). Modelling amyotrophic lateral sclerosis: Progress and possibilities. En *DMM Disease Models and Mechanisms*. <https://doi.org/10.1242/dmm.029058>
- Van Den Bosch, L. (2011). Genetic Rodent Models of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, *2011*, 348765. <https://doi.org/10.1155/2011/348765>
- van Kuilenburg, A. B. P. (2004). Dihydropyrimidine dehydrogenase and the efficacy and toxicity of 5-fluorouracil. *European Journal of Cancer*, *40*(7), 939-950. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2003.12.004>
- van Zundert, B., & Brown, R. H. (2017). Silencing strategies for therapy of SOD1-mediated ALS. *Neuroscience Letters*, *636*, 32-39. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.07.059>
- Vance, C., Rogelj, B., Hortobágyi, T., De Vos, K. J., Nishimura, A. L., Sreedharan, J., Hu, X., Smith, B., Ruddy, D., Wright, P., Ganesalingam, J., Williams, K. L., Tripathi, V., Al-Saraj, S., Al-Chalabi, A., Leigh, P. N., Blair, I. P., Nicholson, G., De Belleruche, J., ... Shaw, C. E. (2009). Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1165942>
- Vanden Broeck, L., Naval-Sánchez, M., Adachi, Y., Diaper, D., Dourlen, P., Chapuis, J., Kleinberger, G., Gistelincq, M., Van Broeckhoven, C., Lambert, J.-C., Hirth, F., Aerts, S., Callaerts, P., & Dermaut, B. (2013). TDP-43 Loss-of-Function Causes Neuronal Loss Due to Defective Steroid Receptor-Mediated Gene Program Switching in *Drosophila*. *Cell Reports*, *3*(1), 160-172. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.12.014>
- Vanderveen, B., Sougiannis, A., Velázquez, K., Carson, J., Fan, D., & Murphy, E. (2020). *The Acute Effects of 5 Fluorouracil on Skeletal Muscle Resident and Infiltrating Immune Cells in Mice*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-40261/v1>
- Veyrat-Durebex, C., Corcia, P., Mucha, A., Benzimra, S., Mallet, C., Gendrot, C., Moreau, C., Devos, D., Piver, E., Pagès, J.-C., Maillot, F., Andres, C. R., Vourc'h, P., & Blasco, H. (2014). Iron Metabolism Disturbance in a French Cohort of ALS Patients. *BioMed Research International*, *2014*, 485723. <https://doi.org/10.1155/2014/485723>

- Voet, S., Srinivasan, S., Lamkanfi, M., & van Loo, G. (2019). Inflammasomes in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases. *EMBO Molecular Medicine*, *11*(6), e10248. <https://doi.org/10.15252/emmm.201810248>
- Vogel, C., & Marcotte, E. M. (2012). Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature Reviews Genetics*. <https://doi.org/10.1038/nrg3185>
- Volk, A. E., Weishaupt, J. H., Andersen, P. M., Ludolph, A. C., & Kubisch, C. (2018). Current knowledge and recent insights into the genetic basis of amyotrophic lateral sclerosis. *En Medizinische Genetik*. <https://doi.org/10.1007/s11825-018-0185-3>
- Waibel, S., Reuter, A., Malessa, S., Blaugrund, E., & Ludolph, A. C. (2004). Rasagiline alone and in combination with riluzole prolongs survival in an ALS mouse model. *Journal of Neurology*, *251*(9), 1080-1084. <https://doi.org/10.1007/s00415-004-0481-5>
- Walker, C., Herranz-Martin, S., Karyka, E., Liao, C., Lewis, K., Elsayed, W., Lukashchuk, V., Chiang, S.-C., Ray, S., Mulcahy, P. J., Jurga, M., Tsagakis, I., Iannitti, T., Chandran, J., Coldicott, I., De Vos, K. J., Hassan, M. K., Higginbottom, A., Shaw, P. J., ... El-Khamisy, S. F. (2017). C9orf72 expansion disrupts ATM-mediated chromosomal break repair. *Nature Neuroscience*, *20*(9), 1225-1235. <https://doi.org/10.1038/nn.4604>
- Wang, G. Y., Rayner, S. L., Chung, R., Shi, B. Y., & Liang, X. J. (2020). Advances in nanotechnology-based strategies for the treatments of amyotrophic lateral sclerosis. *Materials Today Bio*, *6*, 100055. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2020.100055>
- Wang, G., Yang, H., Yan, S., Wang, C.-E., Liu, X., Zhao, B., Ouyang, Z., Yin, P., Liu, Z., Zhao, Y., Liu, T., Fan, N., Guo, L., Li, S., Li, X.-J., & Lai, L. (2015). Cytoplasmic mislocalization of RNA splicing factors and aberrant neuronal gene splicing in TDP-43 transgenic pig brain. *Molecular Neurodegeneration*, *10*(1), 42. <https://doi.org/10.1186/s13024-015-0036-5>
- Wang, I.-F., Guo, B.-S., Liu, Y.-C., Wu, C.-C., Yang, C.-H., Tsai, K.-J., & Shen, C.-K. J. (2012). Autophagy activators rescue and alleviate pathogenesis of a mouse model with proteinopathies of the TAR DNA-binding protein 43. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(37), 15024 LP - 15029. <https://doi.org/10.1073/pnas.1206362109>
- Wang, L., Gutmann, D. H., & Roos, R. P. (2011). Astrocyte loss of mutant SOD1 delays ALS disease onset and progression in G85R transgenic mice. *Human Molecular Genetics*, *20*(2), 286-293. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq463>
- Wang, W.-Y., Pan, L., Su, S. C., Quinn, E. J., Sasaki, M., Jimenez, J. C., Mackenzie, I. R. A., Huang, E. J., & Tsai, L.-H. (2013). Interaction of FUS and HDAC1 regulates DNA damage response and repair in neurons. *Nature Neuroscience*, *16*(10), 1383-1391. <https://doi.org/10.1038/nn.3514>
- Wang, Y., & Kasper, L. H. (2014). The role of microbiome in central nervous system disorders. *Brain, Behavior, and Immunity*, *38*, 1-12. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbi.2013.12.015>
- Watanabe, T., Kaji, R., Oka, N., Bara, W., & Kimura, J. (1994). Ultra-high dose methylcobalamin promotes nerve regeneration in experimental acrylamide neuropathy. *Journal of the Neurological Sciences*, *122*(2), 140-143. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-510X\(94\)90290-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-510X(94)90290-9)

- Waterston, R. H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J. F., Agarwal, P., Agarwala, R., Ainscough, R., Alexandersson, M., An, P., Antonarakis, S. E., Attwood, J., Baertsch, R., Bailey, J., Barlow, K., Beck, S., Berry, E., Birren, B., Bloom, T., ... Lander, E. S. (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature01262>
- Webster, C. P., Smith, E. F., Bauer, C. S., Moller, A., Hautbergue, G. M., Ferraiuolo, L., Myszczyńska, M. A., Higginbottom, A., Walsh, M. J., Whitworth, A. J., Kaspar, B. K., Meyer, K., Shaw, P. J., Grierson, A. J., & De Vos, K. J. (2016). The C9orf72 protein interacts with Rab1a and the ULK1 complex to regulate initiation of autophagy. *The EMBO Journal*, *35*(15), 1656-1676. <https://doi.org/10.15252/emj.201694401>
- Wegorzewska, I., Bell, S., Cairns, N. J., Miller, T. M., & Baloh, R. H. (2009). TDP-43 mutant transgenic mice develop features of ALS and frontotemporal lobar degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908767106>
- White, M. A., Kim, E., Duffy, A., Adalbert, R., Phillips, B. U., Peters, O. M., Stephenson, J., Yang, S., Massenzio, F., Lin, Z., Andrews, S., Segonds-Pichon, A., Metterville, J., Saksida, L. M., Mead, R., Ribchester, R. R., Barhomi, Y., Serre, T., Coleman, M. P., ... Sreedharan, J. (2018). TDP-43 gains function due to perturbed autoregulation in a Tardbp knock-in mouse model of ALS-FTD. *Nature Neuroscience*, *21*(4), 552-563. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0113-5>
- Wightman, B., Ha, I., & Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, *75*(5), 855-862. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90530-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90530-4)
- Williams, A. H., Valdez, G., Moresi, V., Qi, X., McAnally, J., Elliott, J. L., Bassel-Duby, R., Sanes, J. R., & Olson, E. N. (2009). MicroRNA-206 Delays ALS Progression and Promotes Regeneration of Neuromuscular Synapses in Mice. *Science*, *326*(5959), 1549 LP - 1554. <https://doi.org/10.1126/science.1181046>
- Winkler, E. A., Sengillo, J. D., Sagare, A. P., Zhao, Z., Ma, Q., Zuniga, E., Wang, Y., Zhong, Z., Sullivan, J. S., Griffin, J. H., Cleveland, D. W., & Zlokovic, B. V. (2014). Blood–spinal cord barrier disruption contributes to early motor-neuron degeneration in ALS-model mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(11), E1035 LP-E1042. <https://doi.org/10.1073/pnas.1401595111>
- Wobst, H. J., Mack, K. L., Brown, D. G., Brandon, N. J., & Shorter, J. (2020). The clinical trial landscape in amyotrophic lateral sclerosis—Past, present, and future. *Medicinal research reviews*. <https://doi.org/10.1002/med.21661>
- Wong, M., & Martin, L. J. (2010). Skeletal muscle-restricted expression of human SOD1 causes motor neuron degeneration in transgenic mice. *Human Molecular Genetics*, *19*(11), 2284-2302. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq106>
- Wright, M. L., Fournier, C., Houser, M. C., Tansey, M., Glass, J., & Hertzberg, V. S. (2018). Potential Role of the Gut Microbiome in ALS: A Systematic Review. *Biological Research For Nursing*, *20*(5), 513-521. <https://doi.org/10.1177/1099800418784202>
- Wu, D., Cerutti, C., Lopez-Ramirez, M. A., Pryce, G., King-Robson, J., Simpson, J. E., van der Pol, S. M. A., Hirst, M. C., de Vries, H. E., Sharrack, B., Baker, D., Male, D. K., Michael, G. J., & Romero, I. A. (2015). Brain Endothelial miR-146a Negatively Modulates T-Cell Adhesion through Repressing Multiple Targets to Inhibit NF-κB Activation. *Journal of Cerebral Blood*

- Yamanaka, K., Chun, S. J., Boillee, S., Fujimori-Tonou, N., Yamashita, H., Gutmann, D. H., Takahashi, R., Misawa, H., & Cleveland, D. W. (2008). Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Neuroscience*, 11(3), 251-253. <https://doi.org/10.1038/nn2047>
- Yamashita, S., & Ando, Y. (2015). Genotype-phenotype relationship in hereditary amyotrophic lateral sclerosis. *Translational Neurodegeneration*, 4(1), 13. <https://doi.org/10.1186/s40035-015-0036-y>
- Yang, H., Wang, G., Sun, H., Shu, R., Liu, T., Wang, C.-E., Liu, Z., Zhao, Y., Zhao, B., Ouyang, Z., Yang, D., Huang, J., Zhou, Y., Li, S., Jiang, X., Xiao, Z., Li, X.-J., & Lai, L. (2014). Species-dependent neuropathology in transgenic SOD1 pigs. *Cell Research*, 24(4), 464-481. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.25>
- Yerbury, J. J., Farrarwell, N. E., & McAlary, L. (2020). Proteome Homeostasis Dysfunction: A Unifying Principle in ALS Pathogenesis. *Trends in Neurosciences*, 43(5), 274-284. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2020.03.002>
- Yoshino, H., & Kimura, A. (2006). Investigation of the therapeutic effects of edaravone, a free radical scavenger, on amyotrophic lateral sclerosis (Phase II study). *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, 7(4), 247-251. <https://doi.org/10.1080/17482960600881870>
- Zhang, F., Zhang, Q., Ke, Y., Hao, J., Lu, L., Lu, N., & Chen, X. (2018). Serum uric acid levels in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a meta-analysis. *Scientific Reports*, 8(1), 1100. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19609-2>
- Zhao, W., Beers, D. R., Bell, S., Wang, J., Wen, S., Baloh, R. H., & Appel, S. H. (2015). TDP-43 activates microglia through NF- κ B and NLRP3 inflammasome. *Experimental Neurology*, 273, 24-35. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.07.019>
- Zhou, F., Guan, Y., Chen, Y., Zhang, C., Yu, L., Gao, H., Du, H., Liu, B., & Wang, X. (2013). miRNA-9 expression is upregulated in the spinal cord of G93A-SOD1 transgenic mice. *International journal of clinical and experimental pathology*, 6 9, 1826-1838.
- Zhou, H., Huang, C., Chen, H., Wang, D., Landel, C., Xia, P., Bowser, R., Liu, Y.-J., & Xia, X. (2010). Transgenic Rat Model of Neurodegeneration Caused by Mutation in the TDP Gene. *PLoS genetics*, 6, e1000887. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000887>
- Zhou, K., Shi, L., Wang, Y., Chen, S., & Zhang, J. (2016). Recent Advances of the NLRP3 Inflammasome in Central Nervous System Disorders. *Journal of Immunology Research*, 2016, 9238290. <https://doi.org/10.1155/2016/9238290>
- Zhou, Y., Liu, S., Öztürk, A., & Hicks, G. G. (2014). FUS-regulated RNA metabolism and DNA damage repair. *Rare Diseases*, 2(1), e29515. <https://doi.org/10.4161/rdis.29515>
- Zoccollella, S., Bendotti, C., Beghi, E., & Logroscino, G. (2010). Homocysteine levels and amyotrophic lateral sclerosis: A possible link. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, 11(1-2), 140-147. <https://doi.org/10.3109/17482960902919360>
- Zondler, L., Feiler, M. S., Freischmidt, A., Ruf, W. P., Ludolph, A. C., Danzer, K. M., & Weishaupt, J. H. (2017). Impaired activation of ALS monocytes by exosomes. *Immunology and Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/icb.2016.89>

- Zondler, L., Müller, K., Khalaji, S., Bliedehäuser, C., Ruf, W. P., Grozdanov, V., Thiemann, M., Fundel-Clemes, K., Freischmidt, A., Holzmann, K., Strobel, B., Weydt, P., Witting, A., Thal, D. R., Helferich, A. M., Hengerer, B., Gottschalk, K.-E., Hill, O., Kluge, M., ... Weishaupt, J. H. (2016). Peripheral monocytes are functionally altered and invade the CNS in ALS patients. *Acta Neuropathologica*, 132(3), 391-411. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1548-y>
- Zufiría, M., Gil-Bea, F. J., Fernández-Torrón, R., Poza, J. J., Muñoz-Blanco, J. L., Rojas-García, R., Riancho, J., & de Munain, A. L. (2016). ALS: A bucket of genes, environment, metabolism and unknown ingredients. *Progress in Neurobiology*. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2016.05.004>

ABREVIATURAS 8

ABREVIATURAS

A

Actb: Beta actina
AGO: argonauta
ALSFRS-R: Amyotrophic lateral sclerosis functional scale-revised
ALS2: Alsin rho guanine nucleotide exchange Factor ALS2
AMPA: ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
ANG: Angiogenin
ANXA11: annexin A11
APS: persulfato amónico
AR: autosómica recesiva,
ASC: Apoptosis-associated speck-like protein
ALS2: Alsina
ATXN2: ataxin 2
ATP: adenosin trifosfato

B

BSA: albúmina sérica bovina
BCA: ácido bicinconínic
BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro

C

CaMKII: Ca²⁺/Calmodulina Proteína quinasall
CCNF: CYCLIN F
CCL2: Chemokine (C-C Motif) Ligand 2
CCR2: Chemokine (C-C Motif) Receptor 2
cDNA: DNA complementario CHMP2B: charged multivesicular body protein 2B
CHCHD10: coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing protein 10
CNTF: factor neurotrófico ciliar
C9orf72: Chromosome 9 open Reading frame 72
C21orf2: Chromosome 21 open Reading frame 72
CXCR4: C-X-C chemokine receptor type 4
Cx3CR1: Chemokine (C-X3-C Motif) Receptor 1

D

DAMPs: damage associated molecular patterns
DCTN1: dynactin-1
DEPC: diethylpyrocarbonato
5'-DFCR: 5'-desoxi-5-fluorocitidina
5'-DFUR: 5'-desoxi-5-fluorouridina
DHFU: dihidrofluorouracilo
DFT: demencia frontotemporal
DGCR8: DGCR8 microprocessor complex subunit
DNA: ácido desoxirribonucleico
dNTP: Dexosinucleótido Trifosfato
dATP: Desoxiadenosina Trifosfato
dCTP: Desoxicitosina Trifosfato
dGTP: Desoxiguanina Trifostato
dTMP: Desoxitimidina Monofosfato
dTTP: Desoxitimidina Trifosfato
dUTP: Desoxiuridina Trifosfato
DPD: dihidroprimidina deshidrogenasa
dNTPS: deoxynucleotide triphosphates

E

EAAT2: aminoácido excitador tipo 2 Transportador
EGFR: señalización del receptor del factor de crecimiento epidérmico
ELA: Esclerosis Lateral Amiotrófica
ELA-DFT: ELA con demencia frontotemporal
ELAE: ELA esporádica
ELAF: ELA familiar
ELP3: elongator acetyltransferase complex subunit 3
ERBB4: Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 4
EWSR1 Ewing sarcoma breakpoint region 1

F

FBAL: α -fluoro- β -alanina
FDA: Food and Drug Administration
FBAL: α -fluoro- β -alanina
FdUDP: Fluorodesoxiuridina Difosfato
FdUMP: fluorodesoxiuridina monofosfato
FdUTP: fluorodesoxiuridina trifosfato
FIG4 phosphoinositide 5-phosphatase
FoxP3: Forkhead box P3

FUDP: Fluorouridina Difosfato
FUMP: Fluorouridina Monofosfato
FUR: Fluorouridina
FUS: Fused in Sarcoma
FUTP: Fluorouridina Trifosfato

G

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
G-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos
GDNF: Factor neurotrófico derivado de células gliales

H

HDAC4: Histona deacetilasa 4
hnRNPA1: heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1
hnRNPA2 B1N: heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1
HRP: Horseradish Peroxidase
HSPs: Heat shock protein
HSPB8: Heat shock protein beta-8
H₂O agua destilada

I

IGF-1: factor de crecimiento de insulina-1
IL: interleuquina
IPSCs: induced pluripotent stem cells
IRAK: Interleukin-1 receptor-associated kinase 1

K

KIF5A: kinesin family member 5A
KIFAP3: Kinesin Associated Protein 3

L

LCR: Líquido cefalorraquídeo
LX: ligada al sexo

M

MAO-B: monoamino oxidasa B
MATR3: matrin 3
MgCl₂: cloruro de magnesio
miRNAs: MicroRNAs
MLKL: mixed lineage kinase domain-like
MNI: motoneurona inferior
MNS: motoneurona superior
mQ: Milli Q o ultrapura
MSCs: células madre mesenquimales

N

NaCl: cloruro sódico
NaOH: hidróxido sódico

NEFH: neurofilament, heavy polypeptide
NEK1: NIMA related kinase 1
NF-κB: nuclear factor- kappa B
NLRP3: nod-like receptor family pyrin domain containing 3
NMDA: N-metil-D-aspartato
NSCs: neural stem cell

O

OPTN: Optineurin

P

PAMPs: Pathogen associated molecular patterns
PBS: buffer fosfato salino
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
qPCR: PCR a tiempo real
RT-PCR: Retrotranscripción
PFH: punto final humanitario
PFN1: Profilin-1
mPrp: promotor prión de ratón

R

RE: retículo endoplásmico
RIPA: Radioimmunoprecipitation assay
RIPK1: receptor interacting serine/threonine-protein kinase 1
RISC: complejo de silenciamiento inducido por RNA
RNA: Ácido ribonucleico
ROCK: Rho-quinasa
ROS: especies reactivas de oxígeno
RT: retrotranscripción
miRNA: micro-RNA
mRNA: RNA mensajero
ceRNA: RNA endógenos competidores
rRNA: RNA ribosómico
snRNA: RNA nuclear pequeño
tRNA: RNA de transferencia

S

SDS: dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SEM: error estandar de la media
SETX: Senataxin
SIGMAR1: sigma non-opioid intracellular receptor 1
SNC: sistema nervioso central
SOD: superóxido dismutasa
hSOD1: superóxido dismutasa 1 humana

SPAST: spastin
SPG11 spastic paraplegia 11
SQSTM1 /p62 sequestosome-1

T

TAF15: TATA box-binding protein-associated factor 15
TARDBP/TDP43: TAR DNA-binding protein 43
TBK1: ANK-binding kinase
TBS: buffer tris salino
TEMED: tetrametiletilendiamina
TGF- β : factor de crecimiento transformador-beta
Th: T helper
TIA1: T-cell-restricted intracellular antigen-1
TLR4: Toll-like receptor 4
TNF- α : Tumor Necrosis Factor α
TTBS: Tween-Tris-buffered saline
TTC: Fragmento C-terminal de la toxina tetánica
TRAF6: TNF receptor associated factor 6
TUDCA: ácido tauroursodesoxicólico

TS: Timidilato sintetasa
TTBS: Tween-Tris-buffered saline
TUBA4A: tubulin alpha-4A

U

UBQLN2: Ubiquilin-2
UDG: uracil-DNA-glicosilasa
dUMP: desoxiuridina monofosfato
UNC13A: unc-13 homolog A
UPS: Ubiquitin-proteasome system

V

VAPB: Vesicle-associated membrane protein
VCP: Valosin-containing protein
VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular

W

WT: wild type

ANEXO I

ANEXO I

iiii MUCHAS GRACIAS A TODOS!!!!

Adrián Conde

Alba Gómez

Alberto Arruga Artal

Alberto Gil Costa

Alejandra Soriano Redondo

Alejandro Pariente Migoya

Alejandro Gastón Arceiz

Alejandro Aguilar

Alfonso Ferrer Yus

Alfredo Pérez Paricio

Alicia Sánchez

Amado Royo

Amaia González Roldan

Amparo Viel Lleti

Ana Fortes

Ana Lucha

Ana Piraces Ciudad

Ana Perez Arregui

Ana Ordóñez Garcés

Ana Escudero

Ana Cristina Pablo

Ana Elena Abella Bucho

Ana Pilar Hernandez Mareca

Ana Victoria Belloso

Andrea Carilla

Angel Rodriguez Taibo

Angélica María Martín Quelart

Angelita Remon Osta

Antonio Romero Lasheras

Antonio Corbacho Hernández

Antonio Martínez Ballarín

Antonio Callén Mora

Antonio Gracia

Anun Perez Romanos

Aranzazu Regalado

Bárbara Oliván

Beatriz Alcalde Ezquerra

Beatriz Gimenez Izuel

Beatriz Alquézar Bielsa

Beatriz Redondo Gimeno

Begoña Lafuente Bona

Begoña Arizaga

Benjamin Gracia Lazaro

Blas Garcia Rivas

Camille Bertrand

Carla Alcántara

Carlos Founaud Cabeza

Carlos San Martin

Carlos Celdran

Carlos Martinez

| | |
|---------------------------|----------------------------------|
| Carlos Martin | Enrique Serrano Asenjo |
| Carlos Marco Perez | Ernesto Pradas |
| Carmen Orellana Blanco | Esperanza Babio |
| Carmen Hajar Cardona | Esteban Manuel Keenoy |
| Carmen Serrat Larruy | Esteban Alloza Arcusa |
| Carmen Morte Garcia | Ester Seral |
| Carmen Penit | Esther Bentue Rionda |
| Carmen Conde Salgado | Estherilla Perez Arregui |
| Carmen Baras | Eva Mayo |
| Carmina Puyod Alegre | Eva Martín |
| Carol García | Eva Maria Mayo |
| Celestino Deleyto | Félix de la Fuente Gonzalo |
| Chus Sancho | Fernando García Barahona |
| Cindy Arteaga | Fernando Calvera |
| Clementina Rodellar | Fernando Gil |
| Concepción Salueña Nadal | Fernando Mh |
| Consuelo Casallo Mantecon | Francisco Izquierdo |
| Cristina Cm | Francisco Germán Vayón Ramírez |
| Cristina Garrido Vicente | Francisco Javier Malon Izquierdo |
| Cristina Gascon | Francisco Javier Gállego Franco |
| Cristina García | Gema Ruiz |
| Daniela Dias del Salto | Gemma Cepriá |
| David Gimeno | Gerardo Ladron |
| David Ramírez Gómez | German Macia Rodriguez |
| Eduardo Barriobero | Germán Domínguez Vías |
| Eduardo Laiglesia | Germán Pérez Vázquez |
| Eduardo Catalán | Glòria Lorente Soriano |
| Elena Bosch Valle | Gonzalo Anabitarte |
| Elena Cano | Guaxara Medina |
| Elisa Gascón Rodríguez | Guillermo Luquin Melero |

| | |
|------------------------------|---------------------------------|
| Gustavo Garcia | Jose Antonio Laplaza |
| Héctor García Graziani | José Antonio Bea Cascarosa |
| Helena Castillo Monteagudo | José Domingo Dueñas |
| Ida O de Barroso | Jose German Lopez Salazar |
| Ignacio Martínez | José Ignacio Barrachina |
| Ignacio Ruiz Arrondo | Jose Luis Capablo |
| Ignacio Despujol Zabala | José Luis Olleta Castañer |
| Ines Navarro Fajardo | Jose Manuel Martin |
| Inés Pardo Matías | José Manuel Muñoz Domínguez |
| Inmaculada Martín Burriel | Juan Altarriba |
| Inmaculada Andreu Tomas | Juan Carlos Vicente Corral |
| Inmaculada Plaza García | Juan Luis de la Rosa Castinger |
| Isabel Monforte | Juan Luis Mesón Legaz |
| Israel Manzano Sánchez | Juan María Inchaurreaga |
| Javier Martínez Romero | Juan Miguel Sedeño Martinez |
| Javier Fernández | Juana Garcia |
| Javier Miana Mena | Julio León |
| Javier Hernández Guillén | Laura Aracil Hernández |
| Javier Velar | Laura Andres Gines |
| Javier Pérez | Laura Barrachina Porcar |
| Jesus Garcia-Villaraco Gomez | Laura Gonzalez |
| Jesús Lacasa Vidal | Leonor Alegre |
| Jesús García Sánchez | Lola Sarto Asensio |
| Jesús Arauzo | Lorena Fuentes Broto |
| Joaquin Polo Peña | Lourdes Novales Crespo |
| Joaquín Zalaya | Lourdes Lopez |
| Jorge Pinos | Love Cooking Venecia Foods S.L. |
| Jorge Santamera | Luis Casanova Villagrasa |
| Jorge Monsalve Torres | Luis Miguel Valero Sendra |
| José Adolfo Alvarez | Luis Miguel García Vinuesa |

| | |
|--------------------------------|------------------------------------|
| Luisa Luque Berral | María Del Rocío García Aznar |
| Luz Desirée Alemán Rodríguez | Maria Jesus Muñoz Gonzalvo |
| M Jesús Calvo | Maria Jesus Santos Santos |
| M. Angeles Rivas Ballarin | María Jesús Goñi Urrutia |
| M. Carmen Ortiz | María Jesús Pueyo |
| Mª Angeles Acin Viñuales | Maria Jose Diez |
| Mª Ángeles Gimeno Palacios | Maria Jose Rodriguez Trujillo |
| Mª Remedios Gomez | Maria Lourdes Aguirre |
| Ma. Luz Pueyo | María Luisa Calvo |
| Maite Jimeno Palacios | Maria Peña Martinez Rubio |
| Manuel Rocafort Martin | Maria Pilar Lomba Rodriguez |
| Manuel Macia Guntiñas | María Pilar Marzo Campo |
| Manuel Cobos Ruiz | Maria Sierra Jimenez García-Alcalá |
| Manuel Yago Estèvez | Marian Arellano |
| Manuela Navajas López | Mariasol Almiron Begue |
| Mar Novellon Marcen | Marilis Salvador Borrás |
| Maravillas Espín | Marta Gadea |
| Marga Rodriguez Bailera | Marta Soler |
| Mari Carmen Lavilla Almingol | Marta García Gonzalo |
| Mari Cruz Cartagena Albarranch | Marta Pérez |
| Maria Aguilar Ochoa | Marta Castro |
| Maria Bitrian | Marta Ruber |
| Maria Dominguez | Marta Monzon |
| María Martínez Garrido | Martin Montejano |
| María Buil | Mercedes Borja Gómez |
| María Sanchez | Miguel Revilla Calavia |
| María Cerrejón | Miguel Angel Plaza Carrión |
| María Asunción Zapata Jiménez | Miguel Ángel Ruiz Carnicer |
| María Carmen Ocón | Miriam Sanchez Escamilla |
| Maria del Pilar Martín Quelart | Mónica Ortín |

| | |
|---------------------------------|--------------------------------|
| Mónica García | Raquel Arcega Muñoz |
| Nuria Calvo Trullen | Raquel Manzano |
| Nuria Garatachea | Raul López |
| Olga Perez | Regina Gómez |
| Olga Mendez | Rosa Vicente Garcia |
| Olivia Girones | Rosa Serrano Gracia |
| Oscar Garcia Mendoza | Rosa Sancho |
| Pablo López Ortega | Rosana Calvo Til |
| Pablo Fernández Orallo | Rosana Urtasun Diaz |
| Pablo Sordo | Rosario Alvarez |
| Patricia Garcia-Hegardt Anguera | Rubén Ponz Cuenca |
| Patricia Eggea | Samuel Cruz |
| Pello Mugarza Martinez | Samuel Bielsa |
| Pilar Gimeno | Sara Nerin Ballabriga |
| Pilar Sánchez | Sara Remón Oliver |
| Pilar Fernández Colón | Sara Manzano |
| Pilar Gascon Zaragoza | Sara Olivan Garcia |
| Pilar Aladren | Shinemar Cb |
| Pilar Reglero | Silvia Miralles |
| Pilar Bosque | Silvia Padron |
| Pilar Utrilla | Silvia Romeo |
| Pilar Perez Gil | Sonia Isabel Pedrosa Alquézar |
| Pilar Zaragoza | Teodoro José Párraga Antolinos |
| Pilar de Mira Bartolomé | Teresa Rigau Mas |
| Pilar Lafuente Garcia | Toni Moliné |
| Priscila Aleman Marrero | Toño Vila |
| Probolar SI | Trambesós Ute |
| Rafael Pagán Tomás | Verónica Hernández Ballarín |
| Rafael Pérez Vidal | Vicente Camarena Grau |
| Ramon Vinzo | Vicente Ferreira González |

Victor Balbas

Víctor Guerrero Rubio

Virginia Sanz

Xosé Alfredo Naz Fernández

Yariza Hernández Perez

Yolanda Romeo

